

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



|  |   |  |   |   |
|--|---|--|---|---|
| <b>(51) 国際特許分類6</b><br><b>C12N 7/01, 15/45, 15/86, C12P 21/02</b>  | <b>A1</b>   | <b>(11) 国際公開番号</b><br><b>WO97/16539</b><br><br><b>(43) 国際公開日</b><br><b>1997年5月9日(09.05.97)</b> |   |   |
| <table border="1"><tr><td data-bbox="196 449 818 1119"><b>(21) 国際出願番号</b><br/>PCT/JP96/03069<br/><br/><b>(22) 国際出願日</b><br/>1996年10月22日(22.10.96)<br/><br/><b>(30) 優先権データ</b><br/>特願平7/285417<br/>1995年11月1日(01.11.95)<br/><br/><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br/>株式会社 ディナベック研究所<br/>(DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JF)<br/>〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)<br/><b>(72) 発明者: および</b><br/><b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b><br/>永井美之(NAGAI, Yoshiyuki)(JP/JF)<br/>〒150 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号<br/>原町住宅104号 Tokyo, (JP)<br/>加藤 篤(KATO, Atsushi)(JP/JF)<br/>〒205 東京都羽村市神明台2-5-33<br/>神明台住宅807 Tokyo, (JP)</td><td data-bbox="818 449 1459 1119"><b>(21) 国際出願番号</b><br/>PCT/JP96/03069<br/><br/><b>(22) 国際出願日</b><br/>1996年10月22日(22.10.96)<br/><br/><b>(30) 優先権データ</b><br/>特願平7/285417<br/>1995年11月1日(01.11.95)<br/><br/><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br/>株式会社 ディナベック研究所<br/>(DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JF)<br/>〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)<br/><b>(72) 発明者: および</b><br/><b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b><br/>永井美之(NAGAI, Yoshiyuki)(JP/JF)<br/>〒150 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号<br/>原町住宅104号 Tokyo, (JP)<br/>加藤 篤(KATO, Atsushi)(JP/JF)<br/>〒205 東京都羽村市神明台2-5-33<br/>神明台住宅807 Tokyo, (JP)</td></tr></table> |   |  | <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP96/03069<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1996年10月22日(22.10.96)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平7/285417<br>1995年11月1日(01.11.95)<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>株式会社 ディナベック研究所<br>(DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JF)<br>〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)<br><b>(72) 発明者: および</b><br><b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b><br>永井美之(NAGAI, Yoshiyuki)(JP/JF)<br>〒150 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号<br>原町住宅104号 Tokyo, (JP)<br>加藤 篤(KATO, Atsushi)(JP/JF)<br>〒205 東京都羽村市神明台2-5-33<br>神明台住宅807 Tokyo, (JP) | <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP96/03069<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1996年10月22日(22.10.96)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平7/285417<br>1995年11月1日(01.11.95)<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>株式会社 ディナベック研究所<br>(DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JF)<br>〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)<br><b>(72) 発明者: および</b><br><b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b><br>永井美之(NAGAI, Yoshiyuki)(JP/JF)<br>〒150 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号<br>原町住宅104号 Tokyo, (JP)<br>加藤 篤(KATO, Atsushi)(JP/JF)<br>〒205 東京都羽村市神明台2-5-33<br>神明台住宅807 Tokyo, (JP) |
| <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP96/03069<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1996年10月22日(22.10.96)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平7/285417<br>1995年11月1日(01.11.95)<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>株式会社 ディナベック研究所<br>(DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JF)<br>〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)<br><b>(72) 発明者: および</b><br><b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b><br>永井美之(NAGAI, Yoshiyuki)(JP/JF)<br>〒150 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号<br>原町住宅104号 Tokyo, (JP)<br>加藤 篤(KATO, Atsushi)(JP/JF)<br>〒205 東京都羽村市神明台2-5-33<br>神明台住宅807 Tokyo, (JP)  | <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP96/03069<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1996年10月22日(22.10.96)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平7/285417<br>1995年11月1日(01.11.95)<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>株式会社 ディナベック研究所<br>(DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JF)<br>〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)<br><b>(72) 発明者: および</b><br><b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b><br>永井美之(NAGAI, Yoshiyuki)(JP/JF)<br>〒150 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号<br>原町住宅104号 Tokyo, (JP)<br>加藤 篤(KATO, Atsushi)(JP/JF)<br>〒205 東京都羽村市神明台2-5-33<br>神明台住宅807 Tokyo, (JP) |  |   |   |
| <b>(54)Title: RECOMBINANT SENDAI VIRUS</b><br><br><b>(54)発明の名称 組換え体センダイウイルス</b><br><br><b>(57) Abstract</b><br>A method for reconstituting Sendai virions which comprises introducing the genome of Sendai virus into a host wherein all of the early replication genes have been expressed. This method enables gene manipulations of Sendai virus and thus makes it possible to utilize Sendai virus efficiently as a vector.  |   |  |   |   |

(57) 要約

初期複製遺伝子が全て発現している宿主にセンダイウイルスゲノムを導入し、センダイウイルス粒子を再構成する方法を開発した。このことによって、センダイウイルスの遺伝子操作が可能となり、センダイウイルスをベクターとして有効利用できるようになった。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |    |             |    |            |
|----|-----------|----|-------------|----|-------------|----|------------|
| AL | アルバニア     | EE | エストニア       | LR | リベリア        | RU | ロシア連邦      |
| AM | アルメニア     | ES | スペイン        | LS | レソト         | SD | スーダン       |
| AT | オーストリア    | FI | フィンランド      | LT | リトアニア       | SE | スウェーデン     |
| AU | オーストラリア   | FR | フランス        | LU | ルクセンブルグ     | SG | シンガポール     |
| AZ | アゼルバイジャン  | GA | ガボン         | LV | ラトヴィア       | SI | スロベニア      |
| BB | バルバドス     | GB | イギリス        | MC | モナコ         | SK | スロヴァキア共和国  |
| BE | ベルギー      | GE | グルジア        | MD | モルドバ        | SN | セネガル       |
| BG | ブルガリア     | GH | ガーナ         | MG | マダガスカル      | SZ | スワジランド     |
| BJ | ベナン       | GR | ギリシャ        | MK | マケドニア旧ユーゴスラ | ID | インドネシア     |
| BR | ブラジル      | GN | ギニア         | VI | ヴィエトナム      | TG | トーゴ        |
| BY | ベラルーシ     | HU | ハンガリー       | ML | マリ          | TJ | タジキスタン     |
| CA | カナダ       | IE | アイルランド      | MN | モンゴル        | TM | トルクメニスタン   |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IS | アイスランド      | MR | モロッコ        | TR | トルコ        |
| CG | コンゴ       | IT | イタリア        | MW | マラウイ        | TT | トリニダード・トバゴ |
| CH | スイス       | JP | 日本          | MX | メキシコ        | UA | ウクライナ      |
| CI | コート・ジボアール | KE | ケニア         | NE | ニジェール       | UG | ウガンダ       |
| CN | 中国        | KG | キルギスタン      | NL | オランダ        | US | 米国         |
| CZ | チェコ共和国    | KR | 朝鮮民主主義人民共和国 | NO | ノルウェー       | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| DE | ドイツ       | KZ | カザフスタン      | NZ | ニュージーランド    | VN | ベトナム       |
| DK | デンマーク     | LI | リヒテンシュタイン   | PL | ポーランド       | YU | ユーゴスラビア    |
|    |           | LK | スリランカ       | RO | ルーマニア       |    |            |

## 明細書

## 組換え体センダイウイルス

技術分野

本発明は、組換え体センダイウイルスとその製造方法に関する。

技術背景

センダイウイルス (Sendai virus) は、H V J (Hemagglutinating virus of Japan) と呼ばれ、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae)、パラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) に属するパラインフルエンザウイルス 1 型に分類される。

センダイウイルス粒子は多形性であり、直径150～200nmのエンベロープを有し、中に翻訳の鋳型とはならないゲノムRNA (以下「(－) 鎖RNA」と称する。) を有する。センダイウイルスは、歴史的に見ても産業上有用なウイルスとして知られており、とくに細胞のヘテロカリオンや雑種細胞の作製、すなわち細胞融合に広く利用されている。また、膜融合性リボソームの材料として、遺伝子治療用のベクターとしても開発が進められている。さらには、各種インターフェロンの誘導剤としてもセンダイウイルスは利用されている。

ゲノム核酸の形態による分類では、センダイウイルスは、RNAウイルスの、(－) 鎖RNAウイルスの、(－) 1 本鎖RNAウイルスグループに属する。RNAウイルスは、dsRNAウイルス (double stranded RNA virus)、(＋) 鎖RNAウイルスおよび(－) 鎖RNAウイルスの3者に分類される。dsRNAウイルスグループには、レオウイルス、ロタウイルス、植物レオウイルス等があり、分節型の複数の線状dsRNAゲノムを有している。(＋) 鎖RNAウイルスには、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、日本脳炎ウイルス等があり、1本の(＋)

鎖RNAをゲノムとして有しており、このRNAゲノムは同時にmRNAとしても機能し、複製や粒子形成に必要な蛋白質を宿主細胞の翻訳機能に依存して生産することができる。言い換えれば、(+)鎖RNAウイルスが有するゲノムRNA自体が伝播力を有する。なお、本明細書において「伝播力」とは、「感染や人工的な手法で核酸が細胞内に導入された後、細胞内に存在する該核酸が複製後、感染性粒子またはそれに準ずる複合体を形成し、別の細胞に次々と伝播することのできる能力」を言う。(+)鎖RNAウイルスに分類されるシンドビスウイルスや(-)鎖RNAウイルスに分類されるセンダイウイルスは、感染能と伝播力とを有するが、バルボウイルス科に分類されるアデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus)は、感染能を有するが、伝播力を有しない(ウイルス粒子が形成されるためには、アデノウイルスの同時感染が必要である)。また、試験管内で人工的に転写されたシンドビスウイルス由来の(+)鎖RNAは伝播力を有する(細胞内に導入されるとウイルス粒子を形成する)が、試験管内で人工的に転写されたセンダイウイルスRNAは(+)鎖、(-)鎖ともに伝播力を有しない(細胞内に導入されてもウイルス粒子を形成しない)。

近年では遺伝子治療用のベクターとしてウイルス由来のものが用いられている。ウイルスをベクターとして利用するためには、ウイルス粒子の再構成のための手法が確立している必要がある。(「ウイルス粒子の再構成」とは、ウイルスゲノムの核酸を人工的に作製し、試験管内または細胞内において、もとのウイルスまたは組換え体ウイルスを作製することである。)外来性遺伝子をウイルスベクターに導入するためには、遺伝子操作によって外来性遺伝子を組み込んだウイルスゲノムからウイルス粒子が再構成されなくてはならないからである。ウイルスの再構成技術が確立されれば、ウイルスに所望の外来性遺伝子を導入したり、ウイルスの所望の遺伝子を欠失させたり、不活化させたりしたウイルスを作製することが可能となる。

また、ウイルスの再構成系が構築され、ウイルスの遺伝子操作が可能となれば

、ウイルスの機能を遺伝学的に解析する大きなツールとなることは明白である。ウイルス機能の遺伝学的解析は、疾病の予防、治療等の医学的見地からきわめて重要である。例えば、ウイルス核酸の複製メカニズムが解明されれば、その宿主細胞内の核酸の複製機構との差を利用して、宿主細胞にダメージの少ない、核酸の複製を作用点とした抗ウイルス剤を開発することが可能である。また、ウイルス遺伝子のコードする蛋白質がどのような機能を有するかを解明することにより、ウイルス粒子感染能や、ウイルス粒子形成能に関わる蛋白質をターゲットとした抗ウイルス剤を開発することもできよう。また、膜融合能に関わる遺伝子を改良することにより、より優れた膜融合性リボソームを作製し、遺伝子治療用のベクターとして使用することが可能となることが期待できる。また、インターフェロンに代表されるように、ウイルスに感染することにより宿主遺伝子のウイルス抵抗性に関わる遺伝子が活性化され、ウイルス抵抗性を示す場合もある。このような宿主遺伝子の活性化に関しても、ウイルス機能の遺伝学的解析により重要な知見が得られるであろう。

DNAをゲノム核酸とするDNAウイルスの再構成は比較的早くから行なわれており、例えば、SV40 (J. Exp. Cell Res., 43, 415-425(1983)) のように、精製したゲノムDNAそのものをサルの細胞に導入することにより行なうことが可能である。

RNAをゲノム核酸とするRNAウイルスの再構成は、(+)鎖RNAウイルスにおいて開発が先行した。この理由は、ゲノムRNAが、同時にmRNAとして機能するからである。例えば、ポリオウイルスでは、精製したRNA自体が伝播力を有することが、すでに1959年に報告されている (Journal of Experimental Medicine, 110, 65-89(1959))。また、セムリキ森林ウイルス (Semliki forest virus; SFV) では、宿主細胞のDNA依存性RNA転写活性を利用することにより、cDNAを細胞内に導入することによってウイルスの再構成が可能であることが報告されている (Journal of Virology, 65, 4107-4113(1991))。

さらにはこれらの再構成技術を利用して、遺伝子治療用ベクターの開発も進め

られている [Bio/Technology,11,916-920(1993)、Nucleic Acids Research,23,1495-1501(1995)、Human Gene Therapy,6,1161-1167(1995)、Methods in Cell Biology,43,43-53(1994)、Methods in Cell Biology,43,55-78(1994)]。

ところが、前述したとおり、センダイウイルスは産業的に有用なウイルスとして利用しうる長所を多数有しているにもかかわらず、(一)鎖RNAウイルスであるため、再構成系が確立していなかった。そのことは、ウイルスcDNAを経由したウイルス粒子再構成系がきわめて困難だったことに起因する。

前述したように(一)鎖RNAウイルスのRNA(vRNA; viral RNA)またはその相補鎖RNA(cRNA; complementary RNA)を単独で細胞内に導入しても(一)鎖RNAウイルスは生成されることが明らかにされている。このことは、(+)鎖RNAウイルスの場合と決定的に違う点である。なお、特開平4-211377号公報には、「負鎖RNAウイルスのゲノムに対応するcDNAおよび感染性の負鎖RNAウイルスの製造方法」について記載があるが、該公報の実験内容がそのまま記載されている「EMBO.J., 9,379-384(1990)」は、実験の再現性がないことが明らかとなり、筆者みずから論文内容を全面的に取り下げている(EMBO.J.,10,3558(1991)参照)ことからして、特開平4-211377号公報に記載の技術が本発明の先行技術に該当しないのは明らかである。

(一)鎖RNAウイルスの再構成系について、インフルエンザウイルスに関しては報告がある(Annu.Rev. Microbiol.,47, 765-790(1993)、Curr. Opin. Genet. DEV.,2,77-81(1992))。インフルエンザウイルスは、8分節ゲノムより構成される(一)鎖RNAウイルスである。これらの報告によれば、あらかじめそのうちの1つのcDNAに外来性遺伝子を挿入し、また外来性遺伝子を含む8本すべてのcDNAから転写されたRNAをあらかじめウイルス由来のNP蛋白質と会合させてRNPとした。これらのRNPと、RNA依存性RNAポリメラーゼとを細胞内に供給することにより、再構成が成立した。また、(一)鎖一本鎖RNAウイルスについては、ラプトウイルス科に属する狂犬病ウイルスでcDNAからのウイルス再構成についての報告

がある (J. Virol., 68, 713-719(1994))。

従って、(－)鎖RNAウイルスの再構成系技術は基本的には公知のものとなったが、センダイウイルスの場合は、この手法をそのまま適用しても、ウイルスを再構成することができなかった。また、ラブドウイルスにおいてウイルス粒子が再構成されたという報告については、マーカー遺伝子の発現やRT-PCR等で確認を行なっているだけであり、生産量の面から十分とはいえなかった。さらには、従来は、再構成に必要な因子を細胞内で供給する目的で、天然型のウイルスや組換え型のワクチニアウイルス等のウイルスを、再構成すべきウイルスの核酸と同時に細胞に供給しており、再構成された所望のウイルスとそれらの有害なウイルスの分離が容易でないという問題があった。

#### 発明の開示

本発明は、製造効率の良いセンダイウイルス再構成系を確立し、センダイウイルスの遺伝子操作を可能とし、遺伝子治療等の分野で十分実用に耐えうるセンダイウイルスベクターを供給することを課題とする。

本発明者らはまず、センダイウイルスの再構成試験に適用するため、センダイウイルスDI粒子 (defective interfering particle/EMBO.J., 10, 3079-3085(1991)参照) 由来のcDNAまたはセンダイウイルスミニゲノムのcDNAを用いて、種々の検討を行なった。その結果、細胞内に導入する、cDNA、転写複製に関するcDNA群、およびT7RNAポリメラーゼ発現ユニットである組換え体ワクチニアウイルスの量比について、効率の良い条件を見いだした。本発明者らは更に、センダイウイルス全長のcDNAを(+)鎖と(－)鎖の両者とも取得し、細胞内で(+)鎖または(－)鎖のセンダイウイルスRNAが生合成されるようなプラスミドを構築し、転写複製に関するcDNA群を発現している細胞内に導入した。その結果センダイウイルスcDNAよりセンダイウイルス粒子を再構成することに初めて成功した。なお、本発明者らによって、効率良い粒子再構成のためには、細胞内に導入するcDNA

の形態が線状よりも環状のほうが適当であり、また（－）鎖RNAが細胞内で転写されるよりも、（＋）鎖RNAが細胞内で転写されるほうが粒子形成効率が高いことが新たに見い出された。

さらに、本発明者らは、T7RNAポリメラーゼ発現ユニットである組換え体ワクチニアウイルスを用いない場合でもセンダイウイルスの再構成を行いうることを見出した。すなわち、試験管内で転写したセンダイウイルス全長RNAを細胞内に導入し、初期転写複製酵素群のcDNAをT7プロモーター支配下で転写させた場合、ウイルス粒子が再構成された。このことは、初期転写複製酵素群をすべて発現する細胞を構築すれば、ワクチニアウイルスのようなヘルパーウイルスを全く使用せずに組換え体センダイウイルスを作出することが可能であることを示している。なお、初期転写複製酵素群をすべて発現する細胞は、「J.Virology, 68,8413-8417(1994)」に記載されており、該記載を参照して当業者が作出することが可能である。なお、該文献記載の細胞は、センダイウイルス遺伝子のうち、NP、P/C、Lの3者を染色体上に有している293細胞由来の細胞であり、このものは、NP、P/C、Lの3者の蛋白質を発現している。

多くのウイルスベクターの例から、核酸からウイルス粒子の再構成が効率よくできるならば、所望のウイルス遺伝子を組み換えたり、外来性遺伝子を挿入したり、または所望のウイルス遺伝子を不活化させたり、欠失させることは、当業者にとって容易になしうることであることは明らかである。即ち、本発明において初めてセンダイウイルス粒子の再構成に成功したことは、本発明によってセンダイウイルスの遺伝子操作が可能となったことを意味することは、当業者には自明のことである。

すなわち本発明は以下のものを含む。

- (1) 所望の外来性遺伝子を含むかまたは所望の遺伝子が欠失もしくは不活化したゲノムを保持し、伝播力を有する組換え体センダイウイルス、
- (2) 1つ以上の機能蛋白質遺伝子が改変されていることを特徴とする (1)



に記載の組換え体センダイウイルス、

(3) 宿主内で発現可能な外来性遺伝子を有することを特徴とする、(1)または(2)に記載の組換え体センダイウイルス、

(4) (1)～(3)のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスに含まれるRNAを含むRNA、

(5) (1)～(3)のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスに含まれるRNAのcRNAを含むRNA、

(6) (a)(4)または(5)に記載のRNAを転写しうる鋳型cDNAを含むDNAと、(b)該DNAを鋳型として試験管内または細胞内で(4)または(5)に記載のRNAを転写しうるユニットとを含むキット、

(7) (a)センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質(各蛋白質は同等の活性を有する蛋白質でもよい)を発現する宿主と、(b)(4)または(5)に記載のRNAとを含むキット、

(8) センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質(各蛋白質は同等の活性を有する蛋白質でもよい)を発現する宿主に、(4)または(5)に記載のRNAを導入することを含む、(1)～(3)のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスの製造方法、

(9) (a)センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質を発現する宿主、(b)(4)または(5)のいずれかに記載のRNAまたはcRNAを転写しうる鋳型cDNAを含むDNA、(c)該DNAを鋳型として試験管内または細胞内で(4)または(5)に記載のRNAを転写しうるユニットの3者を含むキット、および

(10) センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質を発現する宿主に、(4)または(5)に記載のRNAを転写しうる鋳型cDNAを含むDNAと、該DNAを鋳型として試験管内または細胞内で(4)または(5)に記載のRNAを転写しうるユニットとを導入することを含む、(1)～(3)のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスの製造方法、

(11) 宿主に(3)記載の組換え体センダイウイルスを感染させ、発現した外来性タンパク質を回収する工程を含む、外来性タンパク質の製造方法、

(12) (3)記載の組換え体センダイウイルスを宿主に導入し、培養液または漿尿液を回収することによって取得しうる、発現した外来性タンパク質を含む培養液または漿尿液、および

(13) コードするタンパク質のアンチセンスRNAが転写される向きでプロモーター下流に配置された外来性遺伝子と該プロモーターとを含む、センダイウイルスベクター中に組み込まれた該外来性遺伝子がコードするタンパク質を発現させるためのDNA。

本発明の組換え体センダイウイルスベクターは、例えば、遺伝子工学的に製造した組換え体センダイウイルスベクターゲノムをコードする組換えcDNAを試験管内で転写し、組換え体センダイウイルスゲノムRNAを製造し、該RNAをセンダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質（各蛋白質は同等の活性を有する蛋白質でもよい）を同時に発現する宿主に導入することによって得ることができる。また、別法として、本発明のセンダイウイルスベクターは、①遺伝子工学的に製造した組換え体センダイウイルスベクターゲノムをコードする組換えcDNA、②該DNAを鋳型として細胞内でRNAを転写しうるユニットを、センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質（各蛋白質は同等の活性を有する蛋白質でもよい）を同時に発現する宿主に導入することによって得ることができる。この場合、例えば、①は特定のプロモーター下流に接続されおり、②は該特定のプロモーターに作用するDNA依存性RNAポリメラーゼを発現するDNAでありうる。

本発明の組換え体センダイウイルスにおいて、所望の外来性遺伝子を挿入するかまたは所望の遺伝子を欠失もしくは不活化させる前の材料となるセンダイウイルスとしては、パラインフルエンザ1型に分類される株であれば良く、例えばZ株（Sendai virus Z strain）、フシミ株（Sendai virus Fushimi strain）等が挙げられる。また、DI粒子等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド

等も、材料の一部として使用することができる。

また、本発明の組換え体センダイウイルスは、伝播力を保持する限り、該組換え体に含まれるRNAのいかなる部位にいかなる外来性遺伝子が挿入されていても、またいかなるゲノム遺伝子が欠失または改変されていてもよい。挿入される外来性遺伝子としては、宿主内で発現可能な、各種サイトカインをコードする遺伝子や各種ペプチドホルモンをコードする遺伝子が挙げられる。所望のタンパク質を発現させるためには、所望のタンパク質をコードする外来性遺伝子を挿入する。センダイウイルスRNAにおいては、R1配列 (5'-AGGGTCAAAGT-3') とR2配列 (5'-GTAAGAAAAA-3') との間に、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol.67, No.8, (1993)p.4822-4830)。発現効率挿入した外来性遺伝子の発現量は、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後のRNA塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスRNAにおいては、挿入位置がNP遺伝子に近いほど、挿入された遺伝子の発現量が多いことが知られている。なお、所望のタンパク質を発現させるための宿主としては、組換え体センダイウイルスが感染する細胞であればいかなるものでもよいが、例えば、培養された哺乳動物細胞や鶏卵などがあげられる。これらの宿主に、発現可能な外来性遺伝子を組み込んだ組換え体センダイウイルス感染させ、発現された外来性遺伝子産物を回収することによって、外来性遺伝子産物を効率よく製造することができる。発現されたタンパク質は例えば、培養細胞を宿主とする場合には培養液から、鶏卵を宿主とする場合には尿漿液から、常法によって回収しうる。

なお、外来性遺伝子を(一)鎖のセンダイウイルスRNAが生合成されるようなプラスミドに組み込む際は、外来性遺伝子がコードするタンパク質のアンチセンスRNAが転写される向きで、外来性遺伝子をプロモーター下流に挿入する必要がある。このような「コードするタンパク質のアンチセンスRNAが転写される向きでプロモーター下流に配置された外来性遺伝子と該プロモーターとを含む、センダイウイルスベクター中に組み込まれた該外来性遺伝子がコードするタンパク

質を発現させるためのDNA」は、本発明によって初めて利用可能になったものであり、本発明の一部である。

また、例えば、免疫原性に関与する遺伝子を不活性化したり、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、一部のセンダイウイルスのRNA複製に関与する遺伝子を改変したものでも良い。具体的には、例えば複製因子であるNP蛋白質、C/P蛋白質、L蛋白質の少なくとも一つを改変し、転写、複製機能を高めたり弱めたりすることもできる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、再構成されたセンダイウイルスと所望の薬剤や遺伝子等を封入した人工的なリボソームとを融合させた膜融合リボソームの改良に用いることも可能である。

本発明によって、ゲノムRNAの任意の位置に点変異や挿入を導入することが可能となったが、このことによりウイルスの機能の遺伝学的知見が加速度的に蓄積されることが大いに期待される。例えば、ウイルスRNAの複製メカニズムが解明されれば、その宿主細胞由来の核酸の複製機構との差を利用して、宿主細胞にダメージの少ない、核酸の複製を作用点とした抗ウイルス剤を開発することが可能である。また、ウイルス遺伝子のコードする蛋白質がどのような機能を有するかを解明することにより、ウイルス粒子感染能や、ウイルス粒子形成能に関わる蛋白質をターゲットとした抗ウイルス剤を開発することもできよう。具体的には、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープの解析等に利用できる。また、ウイルスに感染することにより宿主遺伝子のウイルス抵抗性に関わる遺伝子が活性化され、ウイルス抵抗性を示す場合、このような宿主遺伝子の活性化に関しても、ウイルス機能の遺伝学的解析により重要な

知見が得られるであろう。センダイウイルスは、インターフェロンの誘導効果を持つため、種々の基礎的実験に用いられている。この誘導に必要な領域を解析することにより、非ウイルス性のインターフェロンの誘導剤を作製することも考えられる。また、本発明の技術はワクチンの開発にも利用できる。生ワクチンは、人工的に遺伝子を改変した組換え体センダイウイルスを発育鶏卵に接種して製造することも可能であるし、このようにして得られた知見を他の（－）鎖RNAウイルス例えば、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルスのようなワクチンの必要性の高いウイルスに応用することもできよう。さらに、本発明によって、遺伝子治療用のベクターとして組換え体センダイウイルスを用いることも可能となった。本発明のウイルスベクターはセンダイウイルスに由来しているので安全性が高く、しかも本ウイルスベクターは伝播力を保持しているので、少量の投与でも大きな治療効果を上げられることが期待される。なお、治療が完了しウイルスベクターの増殖を抑止する必要が生じた際または治療中に、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主にダメージを与えずに、ウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑止することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 はpUC18/T7(+ )HVJRz. DNAの構成を示す図である。

図 2 はpUC18/T7(－)HVJRz. DNAの構成を示す図である。

図 3 はCV-1細胞へのSeVgp120の感染後の時間とHAUの値及びgp120の発現量との関係を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 センダイウイルス転写ユニットpUC18/T7(－)HVJRz. DNAおよびpU

### C18/T7(+)HVJRz.DNAの作製

T7 プロモーター、(-)鎖RNAが転写されるように設計されたセンダイウイルスcDNA、リボザイム遺伝子をこの順に保持するDNAを、pUC18プラスミドに挿入したプラスミドpUC18/T7(-)HVJRz.DNAを作製した。また、T7 プロモーター、(+)鎖RNAが転写されるように設計されたセンダイウイルスcDNA、リボザイム遺伝子をこの順に保持するDNAを、pUC18プラスミドに挿入したプラスミドpUC18/T7(+)HVJRz.DNAを作製した。pUC18/T7(-)HVJRz.DNAおよびpUC18/T7(+)HVJRz.DNAの構成を図1および図2に示した。

### 〔実施例2〕 cDNAからのセンダイウイルス再構成実験

直径6cmのプラスチックシャーレに通常のトリプシン処理を施したLLC-MK2細胞を2,000,000個とMEM培地(MEM +FBS 10%) 2mlとを添加し、CO<sub>2</sub> 5%, 37°Cの条件下で24時間培養した。培養液を取り除き、1mlのPBSを用いて洗浄した後、多重感染度(moi/multiplicity of infection)が2となるように調製した、T7ポリメラーゼを発現する組換え体ワクチニアウイルスvTF7-3を0.1mlのPBSに懸濁したものを添加した。15分毎にウイルス液が全体にいきわたるようにシャーレを揺らし、1時間の感染を行った。ウイルス溶液を除去し、1mlのPBSを用いて洗浄した。このシャーレに、cDNA溶液を含む培地を添加した。cDNA溶液を含む培地の作製は、以下のように行なった。

表に記した核酸(センダイウイルスの複製に必要な因子を発現するプラスミド、pGEM-L, pGEM-P/C, pGEM-NPを含む)を1.5mlのサンプリングチューブにとり、HBS(Hepes buffered saline; 20mM Hepes pH7.4, 150mM NaCl)を加えて総量を0.1mlにした。表中の(-)または(+)cDNAは、プラスミドpUC18/T7(-)HVJRz.DNAまたはpUC18/T7(+)HVJRz.DNAそのものを示し、/Cは環状のまま、/Lは制限酵素MluIにより直鎖化した後に細胞に導入していることを示す。

他方、ポリスチレンチューブの中で、HBS 0.07ml, DOTAP(ベーリンガー・マンハイム社製)0.03mlを調合し、核酸溶液をこのポリスチレンチューブに移した。こ

の状態、10分静置した。これに、細胞培養液 (2ml MEM +FBS 10%) を添加した。さらにこの中にワクチニアウイルスの阻害剤であるリファンピシン (Rifampicin) とシトシンアラビノシド C (Cytosin arabinoside C/Ara C) を最終濃度がそれぞれ0.1mg/ml, 0.04mg/mlとなるように添加した。これにより、cDNA溶液を含む培地が作製された。

前記のシャーレを40時間 5%CO<sub>2</sub> 37°Cの条件下で培養した。ラバーボリスマンを用いてシャーレ内の細胞をかき取り、エッペンドルフチューブに移し6,000rpm、5分間の遠心を行って細胞成分だけを沈殿し、再度1mlのPBSに懸濁した。この細胞液の一部をそのままの状態、あるいは希釈して10日齢の発育鶏卵に接種した。この細胞液を第1表に示した細胞数となるようにPBSで希釈し、0.5ml 接種した卵を35°C72時間培養後4°Cに移して一晩置いた。この卵の漿尿液をウイルス液として注射器と注射針を用いて回収した。

回収したウイルス液のHAU (hemmagglutinin unit)と、PFU(plaque forming unit)の測定を以下に示す方法で行った。

HAUの測定は以下のように行なった。鶏の血液を、400x g,10分間遠心し、上清を捨てた。残る沈殿を、沈殿の100倍量のPBSで懸濁し、これをさらに400x g, 10分間遠心し、上清を捨てた。この操作をさらに2回、繰り返し、0.1%血球溶液を作製した。ウイルス溶液を段階希釈法により2倍ずつに希釈し、その0.05mlずつを、96穴のタイタープレートに分注した。このタイタープレートに、さらに0.05mlずつの血球溶液を分注し、軽く振動させてよく混ぜた後、4°Cで40分静置した。その後、赤血球の凝集を肉眼で観察し、凝集したもののうち、もっともウイルス溶液の希釈率の高いものの希釈率を、HAUとして示した。

PFUの測定は以下のように行なった。CV-1細胞を、6穴のカルチャープレート上に単層になるように生育させた。カルチャープレートの培地を捨て、段階希釈法により10倍ずつに希釈したウイルス溶液0.1mlずつをそれぞれのカルチャープレート内ウエルに分注し、37°C、1時間感染させた。感染中に血清の含まれていな

い2×MEMと2%寒天を55℃で混ぜ合わせ、さらに最終濃度0.0075mg/mlとなるようにトリブシンを加えた。1時間の感染後、ウイルス溶液を取り除き、寒天と混合した培地3mlずつをそれぞれのカルチャープレート内ウェルに加え、5%CO<sub>2</sub>条件下で37℃3日間保温した。0.2mlの0.1%フェノールレッドを加え、37℃ 3時間保温した後、取り除いた。色の付いていないブランクの数を数え、ウイルスの力価をPFU/mlとして評価した。

表1には、LLC-MK2細胞に導入した鋳型となるセンダイウイルスcDNA、RNA複製に必要な因子のcDNAであるpGEM-L、pGEM-P/CおよびpGEM-NPの量、インキュベーション時間、鶏卵に接種した細胞数、HAU、PFU をそれぞれ示した。

表1

| 鋳型cDNA    | 合計 (μg) | pGEM-L(ug) | pGEM-P/C(ug) | pGEM-NP(ug) | 培養時間 (時) | 細胞数                  | HAU | PFU               |
|-----------|---------|------------|--------------|-------------|----------|----------------------|-----|-------------------|
| (+)cDNA/C | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>5</sup> | 512 | 2×10 <sup>9</sup> |
| (+)cDNA/C | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>5</sup> | 256 | 9×10 <sup>8</sup> |
| (+)cDNA/C | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>6</sup> | 256 | 9×10 <sup>8</sup> |
| (+)cDNA/L | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>5</sup> | <2  | <10               |
| (+)cDNA/L | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>5</sup> | <2  | <10               |
| (+)cDNA/L | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>6</sup> | <2  | <10               |
| (-)cDNA/L | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>4</sup> | <2  | <10               |
| (-)cDNA/L | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>5</sup> | <2  | <10               |
| (-)cDNA/L | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>6</sup> | <2  | <10               |
| (-)cDNA/C | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>4</sup> | <2  | <10               |
| (-)cDNA/C | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>5</sup> | <2  | <10               |
| (-)cDNA/C | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00×10 <sup>6</sup> | 4   | 8×10 <sup>3</sup> |

HAU、PFUをともに示したサンプルを超遠心で沈渣とした後、再浮遊して20%～60%のショ糖密度勾配遠心で精製し、12.5%SDS-PAGEで蛋白質を分離したところ、ここに含まれる蛋白質は、センダイウイルスの蛋白質と同じ大きさのものであった。



この結果から、cDNAを細胞に導入してセンダイウイルスを再構成できることが示された。また、(+)鎖を転写するcDNAを細胞内に導入したときには、(-)鎖を転写するcDNAを導入したときに比べてウイルス粒子が効率よく再構成されることが示された。さらに、cDNAを環状のまま導入したときには、直鎖状にして導入したときに比べてウイルス粒子が効率よく再構成されることが示された。

【実施例3】 センダイウイルス再構成に必要なRNA複製因子の検討

L, P/C, NPを発現するプラスミドが三者ともに必要かどうかを調べる実験を行った。方法は実施例2と同様であるが、実施例2ではcDNAとともに、pGEM-L, pGEM-P/C, pGEM-NPの3者を細胞内に導入したのに対し、本実験では、pGEM-L, pGEM-P/C, pGEM-NPのうちの任意の2者または一者のみをcDNAとともに細胞内に導入した。

表2は、LLC-MK2細胞に導入した鋳型となるセンダイウイルスcDNA、RNA複製に必要な因子のcDNAであるpGEM-L、pGEM-P/CおよびpGEM-NPの量、インキュベーション時間、鶏卵に接種した細胞数、HAU、PFUをそれぞれ示した。

表 2

| 鋳型cDNA    | 合計 ( $\mu$ g) | pGEM-L | pGEM-P/C | pGEM-NP | 培養時間 (時) | 細胞数                | HAU | PFU             |
|-----------|---------------|--------|----------|---------|----------|--------------------|-----|-----------------|
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 2        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^5$ | 256 | $6 \times 10^8$ |
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 2        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | 512 | $4 \times 10^9$ |
| (+)cDNA/C | 10            | 0      | 2        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 0      | 2        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 0        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 0        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 2        | 0       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 2        | 0       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 0      | 0        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 0      | 0        | 4       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 0      | 2        | 0       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 0      | 2        | 0       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 0        | 0       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (+)cDNA/C | 10            | 4      | 0        | 0       | 40       | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |

表 2 から、どの組合わせの 2 者を導入した場合もウイルスの生産が認められなかった。この結果、この 3 種の蛋白質すべてが、再構成には必須であることが確認された。

#### [実施例 4] in vitro転写RNAからのセンダイウイルス再構成実験

実施例 2 で、cDNA からセンダイウイルスが再構成されることを示したが、さらに cDNA を *in vitro* で転写した産物、すなわち vRNA および cRNA でも同様のことができるかどうかを検討した。

センダイウイルス転写ユニット pUC18/T7(-)HVJRz.DNA および pUC18/T7(+)HVJRz.DNA を制限酵素 MluI で直鎖状にした後、これを鋳型として用い、精製 T7 ポリメラーゼ (EPICENTRE TECHNOLOGIES: Ampliscribe T7 Transcription Kit) による *in vitro* RNA 合成を行った。in vitro RNA 合成の方法はキットのプロトコルに従った

。ここで得られたRNA産物を、実施例2のcDNAの代わりに用い、同様の実験を行い、ウイルス生産の評価はHA試験により行った。

結果を表3に示す。

表3

| 鋳型cDNA         | 合計 (μg) | pGEM-L(ug) | pGEM-P/C(ug) | pGEM-NP(ug) | 培養時間 (時) | 細胞数      | HAU | PFU               |
|----------------|---------|------------|--------------|-------------|----------|----------|-----|-------------------|
| in vitro(-)RNA | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00E+06 | 512 | 2×10 <sup>9</sup> |
| in vitro(-)RNA | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00E+06 | 512 | ND                |
| in vitro(+)RNA | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00E+06 | 2   | 5×10 <sup>3</sup> |
| in vitro(+)RNA | 10      | 4          | 2            | 4           | 40       | 1.00E+06 | <2  | ND                |

この結果より、どちらのセンスのRNAを細胞内に導入しても、ウイルスを再構成することができた。

〔実施例5〕 センダイウイルスベクター内に挿入した外来遺伝子の宿主内での発現の検討

(1) 外来遺伝子 (HIV-1 gp120遺伝子) が挿入されたセンダイウイルスベクター「pSeVgp120」の調製

プライマーa (5'-TGCGGCCGCCGTACGGTGGCAATGAGTGAAGGAGAAGT-3') (配列番号: 1) 及びプライマーd (5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGC GTACGTCATCTTTTTCTCTCTGC-3') (配列番号: 2) を用い、「pNI432」上のHIV-1 gp120遺伝子を標準的なPCR法により増幅した。TAクローニングを行い、NotIで消化し、これをNotIで消化した「pSeV18<sup>+</sup>」に挿入した。次いで、これをE.Coliに形質転換し、E.Coliの各コロニーのDNAを「Miniprep」法で抽出し、DraIII消化後電気泳動を行い、泳動されたDNAのうち挿入により期待される大きさのDNA断片を含んでいることが確認されたクローンを選抜することで、陽性クローンを得た（以下、この陽性クローンを「クローン9」と称する）。目的の塩基配列であることを確認後、塩化セシウム密度勾配遠心により、DNAを精製した。なお、これにより得られた、gp120の挿入されたpSeV18<sup>+</sup>を「pSeVgp120」と称する。

(2) pSeVgp120を保持するセンダイウイルス (SeVgp120) の再構成及びgp120の発現の解析

LLCMK2細胞にpGEM NP, P,Lの他に、さらにpSeVgp120を導入した以外は、実施例2と同様の方法で、発育鶏卵のしょう尿液を回収し、HAUの測定及びgp120発現の検討 (ELISA) を行った。HAUの測定は、実施例2と同様の方法で行った。

また、ELISAは以下のように行った。HIV-1に対するモノクローナル抗体で覆った96ウェルプレートに100 $\mu$ lの試料を添加し、37°Cで60分反応させた。PBSで洗浄後、100 $\mu$ lのHRP結合抗HIV-1抗体を添加し、37°Cで60分反応させた。これをPBSで洗浄後、テトラメチルベンチジンを添加し、HRP活性で転換される反応生成物の量を酸性条件下、450nmの吸光度で検出することによりgp120の発現量を測定した。この結果を表4左に示す。

また、得られたウイルス液は、CV-1細胞に感染させ、同様の検討を行った。CV-1細胞を1プレート当たり $5 \times 10^5$ 細胞となるようにまいて生育させ、培地を捨て、PBS(-)で洗浄し、感染多重度10でウイルス液を添加し、室温で1時間感染させた。ウイルス液を捨てPBS(-)で洗浄し、plainMEM培地 (MEM培地に抗生物質AraC、Rif及びトリプシンを添加したもの) を添加して、37°Cで48時間反応させた。反応後、培地を回収し、HAUの測定 (実施例2と同様の方法) 及びgp120発現の検討 (ELISA) を行った。この結果を表4中央に示す。なお、CV-1細胞の培養上清を再度発育鶏卵に接種し、これにより得たウイルス液のHAUの測定結果及びgp120発現の検討 (ELISA) 結果を表4右に示す。

表 4

| 尿漿液(F1)<br>gp120(HAU)            | CV-1 培地(F1)<br>gp120(HAU)           | 尿漿液(F2)<br>gp120(HAU)<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|----------------------------------|-------------------------------------|---|
| 0.10( 4)<br>0.15(32)<br>0.05(32) | 3.46(128)<br>1.81(128)<br>2.20(128) | 1.56, 1.21(512, 512)                          |

表 4 から明らかなように、CV-1細胞で特に高濃度のgp120が生産され（表中央）、また再度発育鶏卵に接種した尿しょう液からも高濃度のgp120が検出された（表右）。なお、表 4 左と表 4 中央には 3 クローンの結果を示してある。

さらに、gp120の発現をウエスタンブロッティング法により解析した。SeVgp120を感染させたCV-1細胞の培地を20,000rpmで1時間遠心し、ウイルスを沈殿させ、その上清をTCA（10%(v/v)、氷上で15分）または70%エタノール（-20℃）で処理し、15,000rpmで15分遠心し、沈降した蛋白質を「SDS-PAGE Sample buffer」（第一化学）と混合し90℃で3分反応させ、10%アクリルアミドゲル上でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行った。泳動後、蛋白質をPVDF膜（第一化学）に転写し、モノクローナル抗体902を室温で1時間反応させた。次いで、T-TBSで洗浄し、抗mIgG（アマシャム社）を室温で1時間反応させ、T-TBSで洗浄した。さらに、HRP結合プロテインA（アマシャム社）を室温で1時間反応させ、T-TBSで洗浄した。これに4-クロロ-1-ナフトール（4CNPlus）（第一化学）を添加し、gp120を検出した。この結果、予想されるgp120の分子量の位置にバンドが検出された。

さらに、CV-1細胞へのSeVgp120の感染後の時間とHAUの値及びgp120の発現量との関係を解析した。10cmプレートに $5 \times 10^6$ 細胞となるようにCV-1細胞をまき、感染多重度10でSeVgp120を感染させ、その後30, 43, 53, 70時間目に1mlの培地を回収し

、等量の新鮮培地と混合して、HAUの測定、gp120発現の検討（ELISA）およびウエスタンブロッティングを行った。この結果を図3に示す。図3から明らかなように、センダイウイルスのHA titerの増加に伴ってgp120生産量も増加する傾向を示した。

〔実施例6〕 種々の型の細胞におけるSeVgp120の増殖及びgp120の発現の解析

種々の型の細胞を用いた以外は実施例5と同様の方法で、HAUの測及びgp120発現の検討（ELISA）を行った。この結果を表5に示す。

表 5

| 細胞型    | 時間（感染後） | HAU | rgp120（ $\mu$ g/ml） |
|--------|---------|-----|---------------------|
| CV-1   | 96      | 32  | 2.5                 |
| LLCMK2 | 48      | 16  | 0.5                 |
| CHO    | 55      | 4   | 0.46                |
| NIH3T3 | 48      | 4   | 0.25                |
| MT4    | 24      | 16  | 0.8                 |
| MOLT4  | 24      | 16  | 1.2                 |

なお、表左は種々の型の細胞へのSeVgp120の感染後の時間を示す。この結果、検討を行ったすべての細胞でSeVgp120の増殖及びgp120の発現が検出された。

〔実施例7〕 センダイウイルスベクター内に挿入したルシフェラーゼ遺伝子の宿主内での発現の検討

ベクター挿入用のルシフェラーゼ遺伝子を単離するため、プライマー（5'-AAG CGGCCGCCAAAGTTCACGATGGAAGAC-3'（30mer））（配列番号：3）及びプライマー（5'-TGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTCTTACTACGGATTATTACAATTTGGACTTTCGCCCC-3'（69mer））（配列番号：4）を用い、鋳型として「pHvluciRT4」を用いて、標準的なPCR法により両端にNotI部位の付加したルシフェラーゼ遺伝子を単離した。次いで、これをNotIで消化したpSeV18<sup>+</sup>に挿入し、ルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたセンダイウイルスベクターを得た。次いで、LLCMK2細胞に導入し、発育鶏卵に

接種した。発育卵のしょう尿膜を切り取り、冷PBS(-)で2回洗浄し、「lysis buffer」(Picagene WACO) 25 $\mu$ lを添加し、よく攪拌してから15000rpmで2分間遠心した。その上清を5 $\mu$ lを採取し、基質(IATRON) 50 $\mu$ lを添加し、96ウェルプレートに入れ、ルミノメーター(Luminous CT-9000D, DIA-IATRON)で蛍光強度を測定した。活性は、cps (counts per second) で表した。この結果、感染後24時間目のCV-1細胞で、特に高いルシフェラーゼ活性が検出された(表6)。なお、ルシフェラーゼ遺伝子の導入されていないセンダイウイルスを対照として用いた(表中の「SeV」で示してある)。また、表には2クローンの検出結果を示した。

表6

| 蛍光強度 (counts/10 sec) |         |                   |
|----------------------|---------|-------------------|
|                      | 尿 漿 膜   | CV-1 (感染後 24 時間目) |
| Luc/SeV              | 669187  |                   |
|                      | 2891560 | 8707815           |
| SeV                  | 69      | 48                |
|                      | 23      | 49                |

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、センダイウイルスcDNAより効率よくウイルス粒子を再構成する系が確立され、センダイウイルスにおける遺伝子操作が可能となり、所望の外來性遺伝子を含むかまたは所望の遺伝子が欠失もしくは不活化したゲノムを保持し、伝播力を有する組換え体センダイウイルスを得ることが可能となった。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGCGGCCGCC GTACGGTGGC AATGAGTGAA GGAGAAGT

38

配列番号：2

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGCGGCCGC GATGAAC TTT CACCCTAAGT TTTT VTTACT ACGGCGTACG TCATCTTTT 60

TCTCTCTGC 69

配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状



配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAGCGCCGC CAAAGTTCAC GATGGAAGAC

30

配列番号：4

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGCGGCCGC ATGAACTTC ACCCTAAGTT TTTCTTACTA CGGATTATTA CAATTTGGAC 60

TTTCCGCCC

69

## 請求の範囲

1. 所望の外来性遺伝子を含むかまたは所望の遺伝子が欠失もしくは不活化したゲノムを保持し、伝播力を有する組換え体センダイウイルス。
2. 1つ以上の機能蛋白質遺伝子が改変されていることを特徴とする請求の範囲1に記載の組換え体センダイウイルス。
3. 宿主内で発現可能な外来性遺伝子を有することを特徴とする、請求の範囲1または2に記載の組換え体センダイウイルス。
4. 請求の範囲1～3のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスに含まれるRNAを含むRNA。
5. 請求の範囲1～3のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスに含まれるRNAのcRNAを含むRNA。
6. (a)請求の範囲4または5に記載のRNAを転写しうる鋳型cDNAを含むDNAと、(b)該DNAを鋳型として試験管内または細胞内で請求の範囲4または5に記載のRNAを転写しうるユニットとを含むキット。
7. (a)センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質（各蛋白質は同等の活性を有する蛋白質でもよい）を発現する宿主と、(b)請求の範囲4または5に記載のRNAとを含むキット。
8. センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質（各蛋白質は同等の活性を有する蛋白質でもよい）を発現する宿主に、請求の範囲4または5に記載のRNAを導入することを含む、請求の範囲1～3のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスの製造方法。
9. (a)センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質を発現する宿主、(b)請求の範囲4または5のいずれかに記載のRNAまたはcRNAを転写しうる鋳型cDNAを含むDNA、(c)該DNAを鋳型として試験管内または細胞内で請求の範囲4または5に記載のRNAを転写しうるユニットの3者を含むキット。
10. センダイウイルスのNP蛋白質、P/C蛋白質およびL蛋白質を発現する宿主に

、請求の範囲 4 または 5 に記載の RNA を転写しうる鋳型 cDNA を含む DNA と、該 DNA を鋳型として試験管内または細胞内で請求の範囲 4 または 5 に記載の RNA を転写するユニットとを導入することを含む、請求の範囲 1 ～ 3 のいずれかに記載の組換え体センダイウイルスの製造方法。

1 1. 宿主に請求の範囲 3 記載の組換え体センダイウイルスを感染させ、発現した外来性タンパク質を回収する工程を含む、外来性タンパク質の製造方法。

1 2. 請求の範囲 3 記載の組換え体センダイウイルスを宿主に導入し、培養液または漿尿液を回収することによって取得しうる、発現した外来性タンパク質を含む培養液または漿尿液。

1 3. コードするタンパク質のアンチセンス RNA が転写される向きでプロモーター下流に配置された外来性遺伝子と該プロモーターとを含む、センダイウイルスベクター中に組み込まれた該外来性遺伝子がコードするタンパク質を発現させるための DNA。

図 1

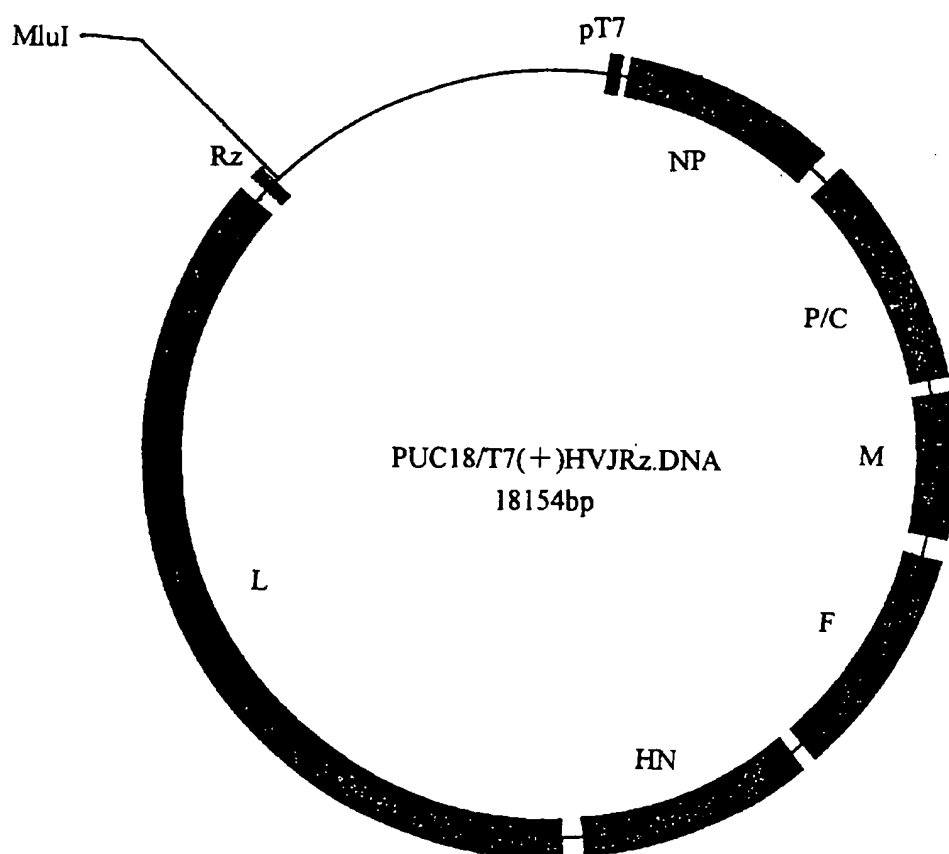
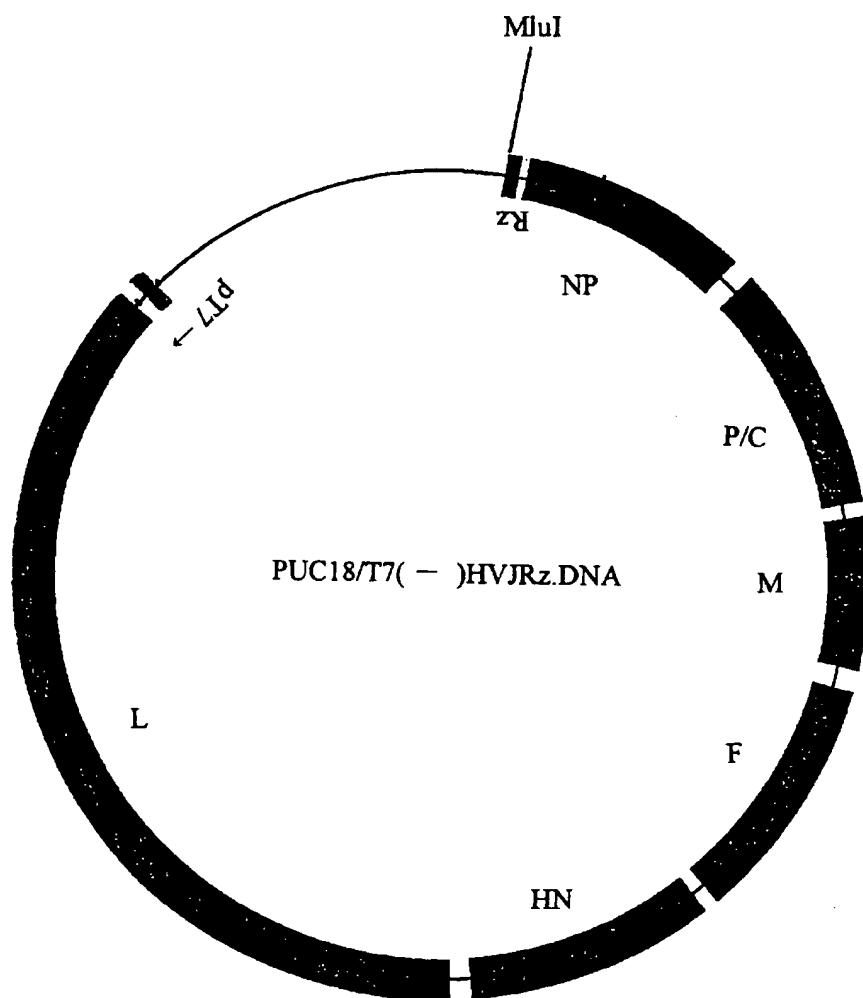
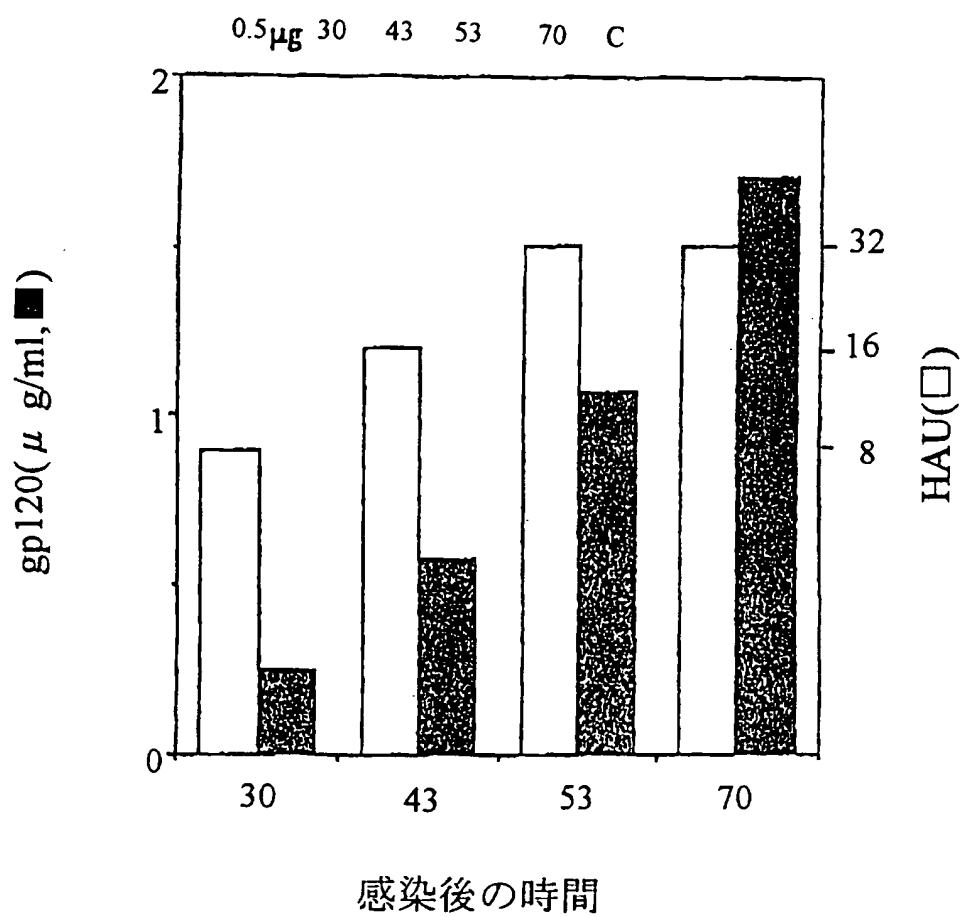


図 2



3/3

図 3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03069

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSYS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | Journal of Virology, Vol. 67(8) (1993) Philippe Calain et al., "The Rule of Six, a Basic Feature for Efficient Replication of Sendai Virus Defective Interfering RNA" p. 4822-4830 (Table 2., Figure 4.)   | 1, 2, 4<br>3, 5-13    |
| Y         | Journal of Virology, Vol. 68(12) (1994) W. Willebrink et al., "Long-Term Replication of Sendai Virus Defective Interfering Particle Nucleocapsids in Stable Helper Cell Lines" p. 8413-8417 (Abstract, p. 8416, left column, line 31 to right column, line 20) | 1 - 13                |
| Y         | JP, 5-85943, A (Tonen Corp.), April 6, 1993 (06. 04. 93) (Family: none)  | 11 - 13               |
| Y         | JP, 5-301895, A (Nippon Zeon Co., Ltd.), November 16, 1993 (16. 11. 93) (Family: none)   | 11 - 13               |
| Y         | JP, 4-30791, A (Tokuyama Soda Co., Ltd.), February 3, 1992 (03. 02. 92) (Family: none)   | 11 - 13               |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 26, 1996 (26. 11. 96)

Date of mailing of the international search report

December 10, 1996 (10. 12. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03069

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | Annu. Rev. Microbiol., Vol. 47 (1993) Adolfo Garcia-Saste et al., "Genetic Manipulation of Negative-Strand RNA Virus Genomes" p. 765-790   | 1 - 13                |
| A         | Journal of Virology, Vol. 66(12) (1992) K. H. Park et al., "In Vivo Model for Pseudo-Templated Transcription in Sendai Virus" p. 7033-7039 | 1 - 13                |
| A         | JP, 4-211377, A (Schweiz Serum & Imp)<br>August 3, 1992 (03. 08. 92)<br>& EP, 440219, A & CA, 2035386, A<br>& AU, 9170074, A               | 1 - 13                |



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/03069

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>6</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>6</sup> C12N7/01, C12N15/45, C12N15/86, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSYS, MEDLINE

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号   |
|-----------------|---|--------------------|
| X<br>Y          | Journal of Virology, Vol. 67[8] (1993) Philippe Calain et al.<br>「The Rule of Six, a Basic Feature for Efficient Replication of Sendai Virus Defective Interfering RNA」 p. 4822-4830<br>(Table 2., Figure 4.)                     | 1, 2, 4<br>3, 5-13 |
| Y               | Journal of Virology, Vol. 68[12] (1994) W. Willenbrink et al.<br>「Long-Term Replication of Sendai Virus Defective Interfering Particle Nucleocapsids in Stable Helper Cell Lines」 p. 8413-8417<br>(Abstract, p. 8416 左欄31行~右欄20行) | 1-13               |
| Y               | JP, 5-85943, A (東燃株式会社)<br>6. 4月. 1993 (06. 04. 93)<br>(ファミリーなし)  | 11-13              |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 11. 96

国際調査報告の発送日

10.12.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴 飼 健

4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | J P, 5-301895, A (日本ゼオン株式会社)<br>16. 11月. 1993 (16. 11. 93)<br>(ファミリーなし)  | 11-13            |
| Y                     | J P, 4-30791, A (徳山曹達株式会社)<br>3. 2月. 1992 (03. 02. 92)<br>(ファミリーなし)  | 11-13            |
| A                     | Annu. Rev. Microbiol., Vol. 47(1993) Adolfo Garcia-Sastre et al.<br>「Genetic Manipulation of Negative-Strand RNA Virus Genomes」 p. 765-790   | 1-13             |
| A                     | Jornal of Virology, Vol. 66[12](1992) K.H. Park et al.<br>「In Vivo Model for Pseudo-Templated Transcription in Sendai Virus」<br>p. 7033-7039 | 1-13             |
| A                     | J P, 4-211377, A (Schweiz Serum & Imp)<br>3. 8月. 1992 (03. 08. 92)<br>& EP, 440219, A & CA, 2035386, A<br>& AU, 9170074, A                   | 1-13             |

## Specification

## Recombinant Sendai Virus

5 Field of the Invention

The present invention relates to the recombinant Sendai virus and the method for preparing the same.

Background of the Invention

10 Sendai virus is also named hemagglutinating virus of Japan (HVJ), and classified in parainfluenza virus type I, belonging to the genus Paramyxovirus of the family Paramyxoviridae.

Sendai virus particle is pleomorphic, having the genome RNA without a function as template for translation (hereafter designated  
15 "negative strand RNA") enclosed in an envelope of 150-200 nm in diameter.

Historically, Sendai virus has also been regarded as an industrially useful virus, being widely utilized, especially for the production of heterokaryons and hybrid cells, by taking advantage of viral cell-fusion capacity. Also, cell-fusing liposomes have been  
20 developed as a vehicle for gene therapy. Furthermore, Sendai virus is also used as the inducer for various interferons.

According to the classification based on the karyotype of genome nucleic acid, Sendai virus belongs to a group of negative single-strand RNA viruses of negative strand RNA viruses among RNA viruses. RNA  
25 viruses are classified into three groups, the dsRNA viruses (double stranded RNA viruses), positive strand RNA viruses, and negative strand RNA viruses. The dsRNA virus group includes reovirus, rotavirus, phytoreovirus, etc., and have segmented, plural filamentous dsRNA genome. Positive strand RNA viruses include poliovirus, Sindbis  
30 virus, Semliki forest virus, and Japanese B encephalitis virus, which possess a single positive sense RNA as genome. The genome RNA can function as an mRNA and is capable of producing proteins required for RNA replication and particle formation depending on the translational functions of host cells. In other words, the genome  
35 RNA itself of positive strand RNA viruses is capable of disseminating.

In the present specification, by "disseminative capability" is meant

"the capability to form infectious particles or their equivalent complexes and successively disseminate them to other cells following the transfer of nucleic acid into host cells by infection or artificial techniques and the intracellular replication of said nucleic acid.

5 Sindbis virus classified to positive strand RNA viruses and Sendai virus classified to negative strand RNA viruses have both infectivity and disseminative capability. On the other hand, adeno-associated virus classified to the parvovirus family has the infectivity but no disseminative capability (the mixed infection of adenovirus is  
10 necessary for the formation of viral particles). Furthermore, the positive strand RNA derived from Sindbis virus which is artificially transcribed *in vitro* is disseminative (to form infectious viral particles when transfected into cells). In contrast, not only negative strand but also positive strand of Sendai viral RNA artificially  
15 transcribed *in vitro* is not disseminative (form no infectious viral particles when transfected into cells).

Recently, viral vectors have been used as vehicles for gene therapy. In order to use them as gene therapy vectors, it is necessary to establish techniques for reconstituting viral particles. (By  
20 "reconstitution of viral particles" is meant the artificial formation of viral genome nucleic acid and the production of original or recombinant viruses *in vitro* or intracellularly.) This is because, in order to transfer foreign genes into viral vectors, viral particles should be reconstituted from the viral genome with foreign genes  
25 integrated by the gene manipulation. Once techniques of viral reconstitution are established, it becomes possible to produce viruses with a desired foreign gene introduced, or with desired genes deleted or inactivated.

Also, once the viral reconstitution system is constructed and  
30 the viral gene manipulation becomes possible, said system appears to become a potential tool for genetically analyzing the viral function.

Genetic analysis of viral functions is very important from the medical viewpoint of prevention and therapy of diseases etc. For example, if the replication mechanism of viral nucleic acid is elucidated  
35 by utilizing the differences between viral metabolism and host-cellular metabolism, it may be possible to develop viricide

acting on the viral nucleic replication process and less damaging to host cells. Also, by elucidating functions of viral gene-encoded proteins, it may become possible to develop antiviral drugs targeting proteins related with the viral infectivity and particle formation.

5 Furthermore, by modifying genes concerned with the membrane fusion and preparing liposomes with superior membrane-fusing capability, it will be able to use them as gene therapy vectors. In addition, as represented by the interferon, the viral infection may induce the activation of host genes for viral resistance, resulting in the enhanced viral resistance of hosts. Genetic analysis of virus  
10 functions may provide more important information on the activation of host genes.

Reconstitution of DNA viruses possessing DNA as the genomic nucleic acid has been performed for some time, and can be carried  
15 out by the introduction of the purified genome itself, such as SV40, into monkey cells [J. Exp. Cell Res., 43, 415-425 (1983)].

Reconstitution of RNA viruses containing an RNA genome has been preceded by positive strand RNA viruses since genomic RNAs also function as mRNA. For example, in the case of poliovirus, the disseminative  
20 capability of the purified genomic RNA itself was already demonstrated in 1959 [Journal of Experimental Medicine, 110, 65-89 (1959)]. Then, it was achieved to reconstitute Semliki forest virus (SFV) by the introduction of cloned cDNAs into host cells utilizing DNA-dependent RNA polymerase activity of host cells [Journal of Virology, 65,  
25 4107-4113 (1991)].

Furthermore, using these viral reconstitution techniques, gene therapy vectors have been developed [Bio/Technology, 11, 916-920 (1993); Nucleic Acids Research, 23, 1495-1501 (1995); Human Gene Therapy, 6, 1161-1167 (1995); Methods in Cell Biology, 43, 43-53  
30 (1994); Methods in Cell Biology, 43, 55-78 (1994)].

However, as described above, in spite of many advantages of Sendai virus to be industrially useful virus, its reconstitution system has not been established, because it is a negative-strand RNA. This is due to tremendous difficulty in reconstituting viral  
35 particles via viral cloned cDNAs.

As described above, it has been clearly demonstrated that a

mere introduction of RNA from negative-strand RNA virus(vRNA) or its complementary strand RNA (cRNA) into host cells does not support the generation of negative-strand RNA virus. This is absolutely different from the case of positive strand RNA viruses. Although, 5 in Tokkai H4-211377, "methods for preparing cDNAs corresponding to negative strand RNA viral genome and infectious negative strand RNA virus" are disclosed, the entire experiments of said documents described in "EMBO. J., 9, 379-384 (1990) were later found to be not reproducible, so that the authors themselves had to withdraw 10 all the article contents [see EMBO J., 10, 3558 (1991)]. Therefore, it is obvious that techniques described in Tokkai H4-211377 do not correspond to the related art of the present invention.

Reconstitution systems of negative strand RNA viruses were reported for influenza virus [Annu. Rev. Microbiol., 47, 765-790 15 (1993); Curr. Opin. Genet. Dev., 2, 77-81 (1992)]. Influenza virus is a negative strand RNA virus having an eight-segmented genome. According to these literatures, a foreign gene was first inserted into the cDNA of one of said genome segments, and then RNA transcribed from the cDNA of all eight segments containing the foreign gene was 20 assembled with the virus-derived NP protein to form RNP. Then, the virus reconstitution was achieved by providing host cells with these RNPs and an RNA-dependent RNA polymerase. Thereafter, the reconstitution of negative single-stranded RNA virus from cDNA was reported for rabies virus belonging to the rhabdovirus family [J. 25 Virol., 68, 713-719 (1994)].

Therefore, although techniques for reconstituting negative strand viruses have become fundamentally known to the public, in the case of Sendai virus, the direct application of these techniques did not support the viral reconstitution. Also, the reconstitution 30 of viral particles reported on the rhabdovirus was confirmed only by the expression of marker genes, RT-PCR, etc. Furthermore, the yield was not satisfactory for practical applications. Besides, in order to provide factors required for the viral reconstitution within host cells, helperviruses such as wild type viruses, recombinant 35 vaccinia virus, etc. were conventionally introduced to host cells together with nucleic acids of the virus to be reconstituted.

Accordingly, difficulties in separating the reconstituted desired virus from these harmful viruses were posing a difficult problem.

#### Disclosure of the Invention

5       The purpose of the present invention is to establish an efficient system for reconstituting Sendai virus, enabling the gene manipulation of Sendai virus, and providing Sendai viral vector sufficiently useful in the field of gene therapy, etc.

10       In order to apply to the reconstitution test of Sendai virus, the present inventors first made various investigations using cDNAs derived from Sendai viral DI particles [ref. defective interfering particle in EMBO J., 10, 3079-3085 (1991)] or the minigenome of Sendai virus. As a result, they found efficient conditions regarding weight ratios among materials to be introduced into host cells, including  
15       cDNA, cDNAs concerning the transcription and replication, and the recombinant vaccinia virus to provide the T7RNA polymerase expression unit. Furthermore, the present inventors obtained full-length cDNAs of both positive and negative strands, constructed plasmids to induce the intracellular biosynthesis of positive or negative strand RNA  
20       of Sendai virus, and transferred said plasmid into host cells expressing cDNAs concerning the transcription and replication. As a result, they succeeded in re-constituting Sendai virus particles from cDNAs thereof. The present inventors also found for the first time that  
25       cDNAs introduced into host cells are more preferable in the circular form than in the linear form for the efficient reconstitution of viral particles, and that positive strand RNAs are superior to negative strand RNAs in the intracellular transcription for the highly successful reconstitution of viral particles.

30       In addition, the present inventors found that Sendai virus could be reconstituted even without using recombinant vaccinia virus as the T7RNA polymerase expression unit. That is, when the full-length RNA of Sendai virus transcribed *in vitro* was transferred into cells, and cDNAs encoding enzymes for the initial transcription and replication were transcribed under the control of T7 promoter, viral  
35       particles were reconstituted. This indicates that, if cells which express all enzymes required for the initial transcription and

replication are constituted, the recombinant Sendai virus can be produced entirely without using helper viruses such as vaccinia virus.

Since cells expressing all enzymes required for the initial transcription and replication were already described [J. Virology, 5 68, 8413-8417 (1994)], those skilled in the art will be able to form such cells with reference to said article. The cell described in said reference is the one derived from the 293 cell line carrying three out of Sendai viral genes, namely NP, P/C and L on its chromosome, and expressing proteins encoded by these three genes, NP, P/C and 10 L.

From numerous examples of viral vectors, if viral particles can be efficiently reconstructed from nucleic acids, it is obvious that those skilled in the art are able to readily exchange desired viral gene, insert a foreign gene, or inactivate or delete a desired 15 viral gene. That is, it will be obvious to those skilled in the art that the first success in reconstituting Sendai viral particles by the present invention has enabled the gene manipulation of Sendai virus.

That is, the present invention comprises the followings.

20 1. A recombinant Sendai virus having the genome with a desired foreign gene inserted or a desired gene deleted or inactivated, and retaining the disseminative capability.

2. The recombinant Sendai virus of description 1, wherein more than one gene encoding functional proteins are modified.

25 3. The recombinant Sendai virus of descriptions 1 or 2 comprising a foreign gene which can be expressed in host cells.

4. An RNA molecule comprising RNAs contained in the recombinant Sendai viruses of any one of descriptions 1-3.

30 5. An RNA molecule comprising cRNAs of RNAs contained in the recombinant Sendai viruses of any one of descriptions 1- 3.

6. A kit consisting of the following two components.

a. a DNA molecule comprising a template cDNA which can transcribe RNAs of descriptions 4 or 5, and

35 b. a unit capable of transcribing RNAs of descriptions 4 or 5 with said DNA as template *in vitro* or intracellular.

7. A kit consisting of the following two components.



a. a host expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus (each protein may be replaced with a protein having an equivalent activity), and

b. an RNA molecule of descriptions 4 or 5.

5        8. A method for producing the recombinant Sendai virus of descriptions 1-3, comprising introducing the RNA molecule of descriptions 4 or 5 into host cells expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus (each protein may be replaced by a protein having the equivalent activity).

10       9. A kit consisting of the following three components,

a. a host expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus,

b. a DNA molecule comprising a template cDNA capable of transcribing RNAs or cRNAs of descriptions 4 or 5, and

15       c. a unit capable of transcribing RNAs of descriptions 4 or 5 with said DNA as template *in vitro* or intracellularly.

10       10. A method for producing the recombinant Sendai virus of descriptions 1-3, comprising introducing the DNA molecule comprising a template cDNA capable of transcribing RNAs of descriptions 4 or 5, and a unit capable of transcribing RNAs of descriptions 4 or 5 with said DNA as template *in vitro* or intracellularly into hosts expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus.

25       11. A method for preparing foreign proteins comprising a process for infecting hosts with the recombinant Sendai virus of description 3, and recovering expressed foreign proteins.

12. A culture medium or chorio-allantoic fluid containing expressed foreign proteins obtainable by introducing the recombinant Sendai virus of description 3 into hosts and recovering said culture medium or chorio-allantoic fluid.

30       13. A DNA molecule realizing the expression of a protein encoded by a foreign gene integrated into a Sendai viral vector comprising said foreign gene inserted downstream of a promoter in an orientation for transcribing antisense RNA encoding said protein, and the said promoter.

35       Recombinant Sendai viral vectors of the present invention can be obtained, for example, by *in vitro* transcribing the recombinant

cDNA encoding the gene-technologically produced recombinant Sendai viral vector genome, producing the recombinant Sendai viral genome RNA, and introducing said RNA to a host simultaneously expressing the NP, P/C and L proteins (each protein may be a protein with an equivalent activity) of Sendai virus. Alternatively, Sendai viral vectors of the present invention can be obtained by introducing

- a) the recombinant cDNA coding for the gene-technologically produced recombinant Sendai viral vector genome, and
- b) a unit capable of intracellularly transcribing RNA with said DNA as template

into a host simultaneously expressing the NP, P/C and L proteins (each protein may be a protein having an equivalent activity) of Sendai virus. In this case, said recombinant cDNA a) may be inserted downstream of a specific promoter, and said transcription unit b) may be a DNA molecule expressing a DNA-dependent RNA polymerase acting on said specific promoter.

Sendai virus, the starting material in the present invention for the insertion of a desired foreign gene, or the deletion or inactivation of a desired gene may be a strain classified to parainfluenza virus type I, exemplified by Sendai virus Z strain or Fushimi strain. Furthermore, incomplete viruses such as DI particles, synthetic oligonucleotides, etc. may be used partial materials.

Also, so far as the recombinant Sendai virus of the present invention maintain the disseminative capability, any foreign gene may be inserted at any site of RNA comprised in said recombinant, and any genome gene may be deleted or modified. Foreign genes to be inserted may be exemplified by genes encoding various cytokines and peptide hormones which can be expressed within hosts. In order to express the desired protein, the foreign gene encoding said desired protein is inserted. In the Sendai viral RNA, it is preferable to insert a sequence of bases of 6 multiplication in number between the sequences R1 (5'-AGGGTCAAAGT-3') and R2 (5'-GTAAGAAAAA-3') [Journal of Virology, Vol. 67, No. 8 (1993) p.4822-4830]. Levels of expression of a foreign gene inserted into a vector can be regulated by virtue of the site of gene insertion and the base sequences flanking

said foreign gene. For example, in the case of Sendai viral RNA, it is known that there are increasing levels of expression of the inserted gene with decreasing distance of said gene from the NP gene.

Preferred hosts for expressing desired proteins may be any cells susceptible to the infection by the recombinant Sendai virus, exemplified by mammalian cells and chicken eggs. It is possible to efficiently produce the foreign gene product by infecting these hosts with the recombinant Sendai virus integrated with expressible foreign gene and recovering the expressed foreign gene product. For example, proteins thus expressed can be recovered by the standard method from the culture medium when cultured cells are the host, and chorio-allantoic fluid when chicken eggs are the host.

When a foreign gene is inserted into a plasmid for expressing the negative strand Sendai viral RNA, it is necessary to insert said foreign gene downstream of the promoter in an orientation for transcribing an antisense RNA of said foreign gene encoding a protein.

Such "a DNA molecule for expressing a protein encoded by a foreign gene integrated into a Sendai viral vector comprising the foreign gene inserted downstream of the promoter in an antisense orientation for transcribing antisense RNA of said foreign gene encoding said protein and said promoter" has become available for the first time by the present invention, comprising a part of said invention.

Also, for example, in order to inactivate genes for immunogenicity, or enhance the efficiency of RNA transcription and replication, part of genes related with RNA replication of Sendai virus may be modified.

Concretely, for example, at least one of the replication factors, the NP, P/C and L proteins may be modified to enhance or reduce the transcription and replication capabilities. The HN protein, one of the constitutional proteins, has dual activities as hemagglutinin and neuraminidase. For example, the reduction of the former activity may increase the viral stability in blood stream, and the modification of the latter activity may enable the regulation of viral infectivity. Also, the modification of the F protein mediating membrane fusion may be useful for improving membrane fusion liposomes constructed by fusing the reconstituted Sendai virus and artificial liposomes enclosing a desired drug or gene.

The present invention has enabled the introduction of point mutation and insertion at any sites of the genomic RNA, and is highly expected to accelerate the accumulation of genetic information on viral functions. For example, once the mechanism of viral RNA replication is elucidated, it may become possible to develop a viricide less harmful to a host cell and targeting nucleic acid replication process by utilizing the differences between the viral and host-cellular metabolisms of nucleic acid. In addition, the elucidation of functions of viral gene-encoded proteins may contribute to the development of viricides targeting proteins involved in infectivity and forming capability of viral particles. Concretely, for example, these techniques may be used for the analysis of antigen-presenting epitopes of the F and HN proteins which may act as antigenic molecules on the cell surface. Also, when a host cell gene for viral resistance is activated by viral infection, resulting in an elevated viral resistance, important information on such activation mechanism of host gene may be obtained by the genetic analysis of viral functions. Since Sendai virus is effective in inducing interferons, it is used in various basic studies. By analyzing the genome region necessary for inducing interferons, it may be possible to produce a non-viral interferon inducer. Techniques of the present invention are useful for the development of vaccines.

Live vaccines may be produced by inoculating the recombinant Sendai virus with attenuating mutations to embryonated chicken eggs. Information thus obtained may be applied to other negative strand viruses, such as measles virus and mumps virus, with high demand for live vaccines. Furthermore, the present invention has enabled the usage of the recombinant Sendai virus as vectors for gene therapy.

Since virus vectors of the present invention derived from Sendai virus are highly safe in the clinical application and disseminative, and expected to be therapeutically effective with a relatively small dosage. In addition, when the suppression of a viral vector replication becomes necessary at the completion of therapy or during the therapy, only the viral vector replication can be specifically suppressed without damaging hosts by administering an inhibitor of RNA-dependent RNA polymerase.

### Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic representation of plasmid pUC18/T7(+)HVJRz.DNA.

5 Figure 2 is a schematic representation of plasmid pUC18/T7(-)HVJRz.DNA.

Figure 3 is a graphic representation of the relationship between the postinfection time of CV-1 cells with SeVgp120 and HAU as well as the level of gp120 expression.

### Best Mode for Carrying out the Invention

In the following, the present invention will be concretely described with reference to examples, but is not limited to these examples.

#### [Example 1] Preparation of Sendai virus transcription units pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA

Plasmid pUC18/T7(-)HVJRz.DNA was constructed by inserting a DNA molecule comprising T7 RNA polymerase promoter, Sendai virus cDNA designed to be transcribed to the negative strand RNA and the ribozyme gene in this order into pUC18 vector. Also, plasmid pUC18/T7(+)HVJRz.DNA was constructed by inserting a DNA molecule comprising T7 RNA polymerase promoter, Sendai virus cDNA designed to be transcribed to the positive strand RNA and the ribozyme gene in this order into pUC18 vector. Constructions of pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA are shown in Figs. 1 and 2, respectively.

#### [Example 2] Reconstitution experiment of Sendai virus from cDNA

30 LLC-MK2 cells ( $2 \times 10^6$ ) trypsinized in a usual manner were placed in a 60-mm diameter plastic dish, and incubated in MEM medium (MEM supplemented with 10% FBS) (2 ml) in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 24 h. After removing the medium and washing with PBS (1 ml), a suspension of recombinant vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 polymerase in PBS (0.1 ml) was added to the cells at the multiplicity of infection (moi) of 2. The dish was gently agitated every 15 min

to thoroughly spread the viral solution for 1 h infection. After removing the viral solution and washing with PBS (1 ml), a medium containing cDNA, which was prepared as follows, was added to the dish.

5 Nucleic acids shown in Tables 1 and 2 (containing plasmids expressing factors required for the replication of Sendai virus, pGEM-L, pGEM-P/C and pGEM-NP) were placed in a 1.5-ml sampling tube, and adjusted to a total volume of 0.1 ml with HBS (Hepes buffered saline; 20 mM Hepes pH 7.4 containing 150 mM NaCl). In those tables,  
 10 (-) and (+)cDNAs represent plasmids pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA, respectively, and /C and /L indicate that cDNA is introduced into cells in the circular form and linear form after the treatment with restriction enzyme MluI, respectively.

On the other hand, in a polystyrene tube were placed HBS (0.07  
 15 ml), DOTAP (Boehringer Mannheim) (0.03 ml). To this tube was added the nucleic acid solution described above, and the mixture was left standing as such for 10 min. Then, to this mixture was added the cell culture medium described above (2 ml, MEM supplemented with 10% FBS) followed by the vaccinia virus inhibitors, rifampicin and  
 20 cytosine arabinoside C (C/Ara/C), to the final concentrations of 0.1 mg/ml and 0.04 mg/ml, respectively, resulting in the preparation of the medium containing cDNA described above.

The dish described above was incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 40 h. The cells in the dish were harvested using a rubber  
 25 policeman, transferred to an Eppendorf tube, sedimented by centrifuging at 6,000 rpm for 5 min, and re-suspended in PBS (1 ml).

Aliquots of this cell suspension, as such or after diluted, were inoculated to 10-days old developing embryonated chicken eggs. That is, the cell suspension was diluted with PBS to the cell numbers  
 30 shown in Table 1, and eggs inoculated with its 0.5-ml aliquots were incubated at 35°C for 72 h, then at 4°C overnight. Chorio-allantoic fluid was recovered as virus solution from these eggs using a syringe with a needle.

Hemagglutinin unit (HAU) and plaque forming unit (PFU) of the  
 35 recovered virus solution were assayed as follows.

HAU was determined as follows. Chicken blood was centrifuged

at 400 x g for 10 min and the supernatant was discarded. Precipitates thus obtained were suspended in 100 volumes of PBS, and centrifuged at 400 x g for 10 min to discard the supernatant. This procedure was repeated twice to prepare an 0.1% blood cell solution. Two-fold  
5 serial dilutions of virus solutions were prepared, and 0.05 ml each dilution to be assayed was dispensed into each well of 96-well titer plate. The blood cell solution (0.05 ml each) was further added to each well, gently swirled to ensure a thorough mixing, and left at 4°C for 40 min. The highest virus dilution to cause the  
10 hemagglutination observable with the naked eye was taken as HAU.

PFU was assayed as follows. CV-1 cells were grown to a monolayer on a 6-well culture plate. After the culture medium was discarded, a virus solution 10-fold serially diluted (0.1 ml each) was dispensed into each well of the culture plate to infect the cells at 37°C for  
15 1 h. During the infection, a mixture of 2 x MEM free of serum and melted 2% agar (55°C) was prepared, and trypsin was added to the mixture to a final concentration of 0.0075 mg/ml. After 1 h infection and removal of the virus solution, the culture medium mixed with agar (3 ml each) was added to each well of the culture plate, and  
20 incubated under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C for 3 days. Phenol red (0.1%) (0.2 ml) was added to each well, incubated at 37°C for 3 h, and then removed. Unstained plaques were counted to estimate the virus titer as PFU/ml.

Table 1 shows Sendai virus template cDNAs transfected into LLC-2  
25 cells, amounts of cDNA factors, pGEM-L, pGEM-P/C, and pGEM-NP, required for the RNA replication, incubation time, cell numbers inoculated to chicken eggs, HAU and PFU values.

Table 1

| Template<br>cDNA | Total<br>amount<br>( $\mu$ g) | pGEM<br>-L<br>( $\mu$ g) | pGEM<br>-P/C<br>( $\mu$ g) | pGEM<br>-NP<br>( $\mu$ g) | Incubation<br>time (h) | Amount<br>of cells | HAU | PFU             |
|------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------|-----|-----------------|
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^5$ | 512 | $2 \times 10^9$ |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^5$ | 256 | $9 \times 10^8$ |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^6$ | 256 | $9 \times 10^8$ |
| (+) cDNA/L       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^5$ | <2  | <10             |
| (+) cDNA/L       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^5$ | <2  | <10             |
| (+) cDNA/L       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (-) cDNA/L       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^4$ | <2  | <10             |
| (-) cDNA/L       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^5$ | <2  | <10             |
| (-) cDNA/L       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^6$ | <2  | <10             |
| (-) cDNA/C       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^4$ | <2  | <10             |
| (-) cDNA/C       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^5$ | <2  | <10             |
| (-) cDNA/C       | 10                            | 4                        | 2                          | 4                         | 40                     | $1.00 \times 10^6$ | 4   | $8 \times 10^3$ |

Samples showing both HAU and PFU were sedimented by ultra-centrifugation, re-suspended, purified by a sucrose density gradient centrifugation from 20% to 60%, and fractionated by 12.5% SDS-PAGE. Each protein contained in these samples was the same in size as that of Sendai virus.

These results demonstrated that Sendai virus can be reconstituted by introducing cDNAs into cells, and that virus particles are more efficiently reconstituted by introducing cDNAs transcribing positive strand RNAs as compared with those transcribing negative strand RNAs, and further by introducing cDNAs in the circular form rather in the linear form.

#### [Example 3] Survey of RNA replication factors required for Sendai virus reconstitution

Experiments were performed to examine whether all three plasmids



expressing the L, P/C and NP proteins were required for the reconstitution of Sendai virus. Experimental methods were similar to those described in Example 2 except that any combinations of two out of pGEM-L, pGEM-P/C and pGEM-NP plasmids or only one out of them,  
 5 instead of all these three combined as in Example 2, were introduced together with a template cDNA into cells.

Table 2 shows Sendai virus template cDNAs introduced into LLC-MK2 cells, amounts of the cDNA factors required for RNA replication including pGEM-L, pGEM-P/C and pGEM-NP, incubation time, number  
 10 of cells inoculated into chicken eggs, and values of HAU and PFU.

Table 2

| Template<br>cDNA | Total<br>amount<br>( $\mu$ g) | pGEM<br>-L | pGEM<br>-P/C | pGEM<br>-NP | Incubation<br>time<br>(h) | Number<br>of cells<br>inoculated | HAU | PFU             |
|------------------|-------------------------------|------------|--------------|-------------|---------------------------|----------------------------------|-----|-----------------|
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 2            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^5$               | 256 | $6 \times 10^8$ |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 2            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | 512 | $4 \times 10^9$ |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 0          | 2            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 0          | 2            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 0            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 0            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 2            | 0           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 2            | 0           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 0          | 0            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA         | 10                            | 0          | 0            | 4           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 0          | 2            | 0           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/c       | 10                            | 0          | 2            | 0           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 0            | 0           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |
| (+) cDNA/C       | 10                            | 4          | 0            | 0           | 40                        | $1.00 \times 10^6$               | <2  | <10             |

As shown in Table 2, no virus reconstitution was observed by

introducing any combinations of two out of these three factors into cells, confirming the necessity of all three proteins L, P/C and NP for the virus reconstitution.

5    [Example 4] Reconstitution experiment of Sendai virus *in vitro* from transcribed RNAs

10    Since the reconstitution of Sendai virus from the functional cDNA clones was described in Example 2, it was further examined whether transcription products of said cDNAs *in vitro*, that is, vRNA and cRNA, can support similar reconstitution.

15    After the Sendai virus transcription units, pUC18/T7(-)HVJRz.DNA and pUC18/T7(+)HVJRz.DNA, were linearized with restriction enzyme MluI, using these DNAs as templates, RNA synthesis was performed *in vitro* with a purified T7 polymerase preparation (EPICENTRE TECHNOLOGIES: Ampliscribe T7 Transcription Kit). The method for synthesizing *in vitro* RNAs essentially followed the protocols provided with the kit. Using RNA products thus obtained in place of cDNAs in Example 2, similar experiments were performed, and the virus production was estimated by HA test. Results are shown in Table 3.

Table 3

| Template<br>cDNA    | Total<br>amount<br>( $\mu$ g) | pGEM-L<br>( $\mu$ g) | pGEM-P/C<br>( $\mu$ g) | pGEM-NP<br>( $\mu$ g) | Incubation<br>time (h) | Number of<br>cells<br>inoculated | HAU | PFU             |
|---------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|-----|-----------------|
| in vitro<br>(-) RNA | 10                            | 4                    | 2                      | 4                     | 40                     | $1.00 \times 10^6$               | 512 | $2 \times 10^9$ |
| in vitro<br>(-) RNA | 10                            | 4                    | 2                      | 4                     | 40                     | $1.00 \times 10^6$               | 512 | ND              |
| in vitro<br>(+) RNA | 10                            | 4                    | 2                      | 4                     | 40                     | $1.00 \times 10^6$               | 2   | $5 \times 10^3$ |
| in vitro<br>(+) RNA | 10                            | 4                    | 2                      | 4                     | 40                     | $1.00 \times 10^6$               | <2  | ND              |

These results indicate that virus can be reconstituted by introducing either negative or positive sense strand RNAs into cells.

[Example 5] Expression of foreign genes inserted into Sendai viral vectors in host cells

1. Preparation of Sendai virus vector "pSeVgp120" inserted with a foreign gene (HIV-1 gp120)

5        Using a set of primers comprising primer a  
       (5'-TGCGGCCGCGTACGGTGGCAATGAGTGAAGGAGAAGT-3') (SEQ ID NO:1) and  
       primer d  
       (5'-TTGCGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTTATTACTACGGCG-TACGTCATCTTT  
       TTTCTCTCTGC-3') (SEQ ID NO:2), the HIV-1gp120 gene was amplified  
 10 on "pN1432" by the standard PCR techniques. PCR products were subjected  
       to TA cloning, digested with NotI, and then inserted into the NotI  
       site of "pSeV18<sup>+</sup>". Then, *E. coli* cells were transformed with this  
       recombinant plasmid. DNAs were extracted from each colony of *E.*  
       *coli* by the "Miniprep" method, digested with DraIII, and then  
 15 electrophoresed. Positive clones (designated "clone 9" hereafter)  
       were selected by confirming to contain DNA fragments of the size  
       expected from the insertion. After DNA fragments were confirmed  
       to have the authentic nucleotide sequence, DNAs were purified by  
       a cesium chloride density gradient centrifugation. pSeV18<sup>+</sup> inserted  
 20 with the gp120 gene is designated "pSeVgp120" hereafter.

2. Reconstitution of Sendai virus containing pSeVgp120 (SeVgp120)  
 and analysis of gp120 expression

      Except for the further transfection of pSeVgp120 into LLCMK2  
       cells, in addition to pGEM-NP, pGEM-P/C and pGEM-L, chorio-allantoic  
 25 fluid was recovered from embryonated chicken eggs and assayed for  
       the viral HAU by exactly as described in Example 2. The recovered  
       virus was also examined for the expression of gp120 by ELISA as follows.

      Samples (100  $\mu$ l each) were dispensed into each well of a 96-well  
       plate which had been coated with monoclonal antibody against HIV-1,  
 30 and incubated at 37°C for 60 min. After washing with PBS, HRP-linked  
       anti-HIV-1 antibody (100  $\mu$ l each) was added to each well, and incubated  
       at 37°C for 60 min. After washing with PBS, tetramethylbenzidine  
       was added to each well, and amounts of reaction product converted  
       by the action of HRP under acidic conditions were determined by following  
 35 the optical density at 450 nm to estimate the expression amount  
       of gp120. Results are shown in the left-hand column in Table 4.

The virus solution thus obtained was inoculated to CV-1 cells, and similarly examined as follows. CV-1 cells were dispensed to a culture plate at  $5 \times 10^5$  cells/plate, grown, and then the culture medium was discarded. After washing with PBS(-), the viral solution was added to the cells at the multiplicity of infection of 10, and incubated at room temperature for 1 h. After the virus solution was discarded, washed with PBS(-), a plain MEM medium (MEM medium supplemented with antibiotics AraC and Rif, and trypsin) was added to the cells, and incubated at 37°C for 48 h. After the reaction, the medium was recovered and assayed for HAU (by a similar method as described in Example 2) and examined for the expression of gp120 (by ELISA). Results are shown in the center column of Table 4. In addition, the supernatant of CV-1 cell culture medium was inoculated to embryonated chicken eggs again, and the virus solution thus obtained was assayed for HAU and also examined for the gp120 expression (by ELISA). Results are shown in the right hand column of Table 4.

Table4

| (μg/ml)                                       |                                 |   |
|---|---------------------------------|---|
| Chorio-allantoic<br>fluid (F1)<br>gp120 (HAU) | CV-1 medium (F1)<br>gp120 (HAU) | Chorio-allantoic<br>fluid (F2)<br>gp120 (HAU) |
| 0.10 ( 4)                                     | 3.46 (128)                      |   |
| 0.15 (32)                                     | 1.81 (128)                      | 1.56, 1.21 (512, 512)                         |
| 0.05 (32)                                     | 2.20 (128)                      |   |

As shown in Table 4, markedly high concentrations of gp120 were detected in CV-1 cells in culture (center column of the Table), and also in the chorio-allantoic fluids from embryonated chicken eggs inoculated again with the virus (right-hand column of the Table).

In the left-hand and center columns of the Table are shown the mean values of three clones.

Furthermore, the expression of gp120 was analyzed by Western blotting. After the culture medium of CV-1 cells infected with SeVgp120 was centrifuged at 20,000 rpm for 1 h to sediment virus, the supernatant was treated with either TCA (10%, v/v) for 15 min on ice or 70% ethanol at -20°C, and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min. Proteins thus

precipitated were mixed to react with an "SDS-PAGE sample buffer" (Daiichi Chemicals) at 90°C for 3 min, and then subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Proteins thus fractionated were transferred to PVDF membranes (Daiichi Chemicals), reacted with monoclonal antibody 902 at room temperature for 1 h, and then washed with T-TBS. The membranes were reacted with anti-mIgG (Amersham) at room temperature for 1 h, and washed with T-TBS. The membranes were then reacted with HRP-linked protein A (Amersham) at room temperature for 1 h, washed with T-TBS, and 4-chloro-1-naphthol (4CNPlus) (Daiichi Chemicals) was added to detect gp120. As a result, protein bands were visualized at positions corresponding to the expected molecular weight of gp120.

In addition, effects of postinfection time of CV-1 cells transfected with SeVgp120 on the HAU value and gp120 expression amount were analyzed. CV-1 cells ( $5 \times 10^6$ ) dispensed to 10-cm plate were infected with SeVgp120 at the multiplicity of infection of 10, and the culture medium (1 ml each) was postinfectionally recovered at 30, 43, 53 and 70 h, mixed with an equal volume of the fresh medium, and subjected to HAU assay, gp120 expression examination (by ELISA) and Western blotting. Results are shown in Figure 4. As clearly shown in Fig. 3, the production of gp120 tends to increase with the increasing HA titer of Sendai virus.

[Example 6] Analyses of SeVgp120 propagation and gp120 expression level in various types of cells

Using similar methods as those in Example 5 except for the use of various types of cells, HAU and gp120 expression levels (by ELISA) were assayed. Results are shown in Table 5.

Table 5

| Cell type | Time (postinfection) | HAU | rgp120 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----------|----------------------|-----|-----------------------------|
| CV-1      | 96                   | 32  | 2.5                         |
| LLCMK2    | 48                   | 16  | 0.5                         |
| CHO       | 55                   | 4   | 0.46                        |
| NIH3T3    | 48                   | 4   | 0.25                        |
| MT4       | 24                   | 16  | 0.8                         |
| MOLT4/    | 24                   | 16  | 1.2                         |

In the left-hand column of the Table are shown the postinfectious times of various types of cells transfected with SeVgp120. As a result, SeVgp120 propagation and gp120 expression were detected in all types of cells tested.

[Example 7] Studies on the expression of luciferase gene inserted into the Sendai viral vector in host cells

In order to isolate the luciferase gene for inserting to vectors, the luciferase gene bounded by the engineered NotI sites on both termini was constructed by the standard PCR using a set of primers [5'-AAGCGCCGCGCCAAAGTTCACGATGGAAGAC-3'] (30mer) (SEQ ID NO: 3)] and [5'-TGCGGCCGCGATGAACCTTTCACCC-TAAGTTTTTCTTACTACGGATTATTACAATTTGGA CTTTCCGCCC-3' (69mer) (SEQ ID NO: 4) with "pHvluciRT4" as a template.

The PCR product was cloned into the NotI window of pSeV18<sup>+</sup> to obtain Sendai virus vector to which the luciferase gene was inserted. Then, this recombinant vector was transfected into LLCMK2 cells, and inoculated into embryonated chicken eggs. Chorio-allantoic membranes of developing eggs were excised out, twice washed with cold PBS(-), and, after the addition of a lysis buffer (Picagene WAKO) (25  $\mu\text{l}$ ) and thorough mixing, centrifuged at 15,000 rpm for 2 min. To the supernatant (5  $\mu\text{l}$  each) was added the substrate (IATRON) (50  $\mu\text{l}$ ), and the mixture was dispensed into each well of a 96-well plate. Fluorescent intensity was measured with a luminometer (Luminous CT-9000D, DIA-IATRON), and the enzyme activity was expressed as counts per second (CPS). As a result, an extremely high luciferase activity was detected with CV-1 cells at 24-h postinfection (Table 6). In

these experiments, Sendai virus which did not carry the luciferase gene was used as control (represented by "SeV" in the table). Results obtained from two clones are shown in the table.

Table 6

| Fluorescence intensity (counts/10 sec) |                              |                          |
|--|------------------------------|--------------------------|
|  | Chorio-allantoic<br>membrane | CV-1 (24h postinfection) |
| Luc/SeV                                | 669187                       |                          |
|  | 2891560                      | 8707815                  |
| SeV                                    | 69                           | 48                       |
|  | 23                           | 49                       |

## 5 Industrial Applicability

By the present invention, a system for efficient reconstitution of viral particles from Sendai viral cDNAs has been established, enabling the gene manipulation of Sendai virus to produce the recombinant Sendai virus comprising a genome with a desired foreign gene inserted or a desired gene deleted or inactivated, but retaining the disseminative capability.

### Sequence Listing

SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 1

15 LENGTH: 38 base pairs

TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)

20 SEQUENCE

TGCGGCCGCC GTACGGTGGC AATGAGTGAA GGAGAAGT 38

SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 2

LENGTH: 69 base pairs

25 TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)

## SEQUENCE

TTGCGGCCGC GATGAAC TTT CACCCTAAGT TTTT VTTACT ACGGCGTACG TCATCTTTT 60  
TCTCTCTGC 69

5 SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 3

LENGTH: 30

TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

10 MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)

## SEQUENCE

AAGCGGCCGC CAAAGTTCAC GATGGAAGAC 30

SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 4

15 LENGTH: 69

TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: single

TOPOLOGY: linear

MOLECULE TYPE: other nucleic acid (synthetic DNA)

20 SEQUENCE

TGCGGCCGCC ATGAAC TTT ACCCTAAGT TTTCTTACTA CGGATTATTA CAATTGGAC 60  
TTTCCGCCC 69



## CLAIMS

1. A recombinant Sendai virus containing a genome having a desired foreign gene inserted, or a desired gene deleted or inactivated,  
5 but retaining the disseminative capability.
2. The recombinant Sendai virus of Claim 1 in which one or more than one gene encoding functional proteins are altered.
- 10 3. The recombinant Sendai virus of Claims 1 or 2 comprising a foreign gene capable of being expressed in hosts.
4. An RNA molecule comprising RNA contained in the recombinant Sendai virus of any one of Claims 1-3.
- 15 5. An RNA molecule comprising cRNAs of RNAs contained in the recombinant Sendai virus of any one of Claims 1-3.
6. A kit comprising
  - 20 a. a DNA molecule containing a template cDNA capable of transcribing RNA of Claims 4 or 5, and
  - b. a unit capable of transcribing said RNA of Claims 4 or 5 with said DNA as template *in vitro* or intracellularly.
- 25 7. A kit comprising
  - a. a host expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus (each protein may be replaced with a protein of an equivalent activity), and
  - b. the RNA molecule of Claims 4 or 5.
- 30 8. A method for producing the recombinant Sendai virus of any one of Claims 1-3, comprising transfecting RNA of Claims 4 or 5 to a host expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus (each protein may be replaced with a protein of an equivalent activity).
- 35 9. A kit consisting of the following three components,

- a. a host expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus,
  - b. a DNA molecule containing a template cDNA capable of transcribing RNA or cRNA of any one of Claims 4 or 5, and
  - c. a unit capable of transcribing RNA of Claims 4 or 5 with said
- 5 DNA as template in vitro or intracellularly.

10. A method for producing the recombinant Sendai virus of any one of Claims 1-3, wherein said method comprises introducing a DNA molecule containing a template cDNA capable of transcribing RNA of Claims

10 4 or 5, and a unit capable of transcribing RNA of Claims 4 or 5 with said DNA as template *in vitro* or intracellularly into a host expressing the NP, P/C and L proteins of Sendai virus.

11. A method for producing a foreign protein, comprising a process

15 of infecting a host with the recombinant Sendai virus of Claim 3, and recovering expressed foreign proteins.

12. A culture medium or chorio-allantoic fluid containing the expressed foreign proteins obtainable by transfecting the recombinant Sendai

20 virus of Claim 3 to a host, and recovering said culture medium or chorio-allantoic fluid.

13. A DNA molecule for expressing a protein encoded by a foreign gene integrated into a Sendai virus vector comprising said foreign

25 gene inserted downstream of a promoter in an (antisense) orientation for the transcription of antisense RNA encoding said protein and said promoter.

## ABSTRACT

A method for regenerating Sendai virus particles by transfecting the Sendai virus genome to a host expressing all genes for the initial  
5 viral replication has been developed, enabling the genetic manipulation of Sendai virus and effective utilization of said virus as the vector.